

THESIS
MARBURG 1966
Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg a. d. Lahn

Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Trübung in der Kaninchenhornhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinrich Lichte
aus Emden/Ostfriesland

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus der Universitäts-Augenlinik Marburg a. d. Lahn
Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Trübung in der Kaninchenhornhaut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinrich Lichte
aus Emden/Ostfriesland

Marburg 1966

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 22.2.66

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med O.Braun-Falco
Referent: Prof.Dr.med W.Straub
Correferent: Dozent Dr.med W.Aust

BEZIEHUNG ZWISCHEN ENERGIESTOFFWECHSEL UND
TRÜBUNG IN DER KANINCHENHORNHAUT.

I.	Einleitung und Literatureinführung.	Seite 1
II.	Fragestellung.	Seite 8
III.	Methodischer Teil:	Seite 10
	1) Präparation der Hornhaut.	Seite 10
	2) Lagerung der Hornhaut.	Seite 10
	3) Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe.	Seite 17
	4) Bestimmung der Metabolite im Extrakt und Berechnung der Einzelwerte.	Seite 17
	5) Trübungsmessung.	Seite 24
	6) Statistik.	Seite 25
IV.	Ergebnisse:	Seite 28
	1) Die Metabolite der Hornhaut in vivo.	Seite 28
	2) Veränderungen der Metabolite nach Lagerung und ihre Beziehung zur Trübung.	Seite 31
	3) Veränderungen der Metabolite nach Lagerung in CO ₂ -Atmosphäre u. ihre Beziehung zur Trübung.	Seite 35
V.	Diskussion:	Seite 41
	Beziehung zwischen Literatur und eigenen Ver- suchsergebnissen.	
	Allgemeine biochemische Aspekte.	
VI.	Zusammenfassung.	Seite 49
VII.	Methodischer Anhang: Tabellen der Einzelwerte.	Seite 51
VIII.	Literaturverzeichnis.	Seite 59



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Seit REISINGER 1824 die erste lebende Hornhaut am Tier-
auge überpflanzte und ihre trübe Einheilung beschrieb,
besteht ein reges Interesse an den Problemen der Horn-
hautüberpflanzung. Es sind seit dieser Zeit große Fort-
schritte gemacht worden. Dennoch konnte man noch 1940
mit einer Erfolgshäufigkeit von nur etwa 10 % rechnen,
wenngleich in bestimmten Fällen auch schon teilweise
klar gebliebene, gut eingehheilte Transplantate von Wert
sind, so liegt dank verbesserter Operationstechnik, die
in erster Linie durch Verfeinerung des Instrumentariums
und des Nahtmaterials ermöglicht wurde, die Erfolgsquote
heute erfreulich höher.

FILATOW, ein besonderer Kenner dieses Gebietes, kam
1931 nach einer großen Zahl von Transplantationen zu dem
Gesamturteil, daß das Einheilen und Klarbleiben von im
Kühlschrank aufbewahrter Hornhaut nicht schlechter ist,
als bei Verwendung von lebensfrischem oder sogar embryo-
nalem Gewebe. FILATOW, LÖHLEIN sowie NIZETIC sahen nach
mehrtägiger Aufbewahrung der Hornhaut im Kühlschrank bei
 $+4^{\circ}\text{C}$ keinen Unterschied im Vergleich zur Sofortübertra-
gung.

Die Frage, ob überpflanztes Hornhautgewebe lebt, erregte
von jeher Interesse, wie das Vorgehen bei der Trans-
plantation und die Auswahl des Überpflanzungsmaterials
zeigen: anorganisches Material, lebende Hornhaut, embryo-
nale Hornhaut, tierische oder menschliche Hornhaut, Lei-
chenhornhaut, formolfixierte Hornhaut wurden erprobt.
Eine Antwort auf diese Frage suchte man auf verschiedene
Weise: FILATOW und BAJENOWA legten von Leichenhornhäuten
nach zehntägiger Aufbewahrung im Kühlschrank Zellkultu-
ren an und sahen noch nach zehn Tagen Epithelien und
Fibrocyten auswachsen. PUPENKO untersuchte 1936 die iso-
lierte Hornhaut histologisch und fand noch nach 8 Tagen
Mitosen. BUSSE-GRAWITZ zeigte, daß die Hornhaut eine

große Widerstandskraft gegen erhöhte Temperaturen besitzt. Erst bei Temperaturen von 170 bis 175°C sterben die Zellen ab. Nach 30-stündiger Behandlung mit 10%igem Formalin ist die Hornhaut schwer geschädigt, aber nicht tot. Die im Laufe der Jahrzehnte zusammengetragenen Erfahrungen sprechen dafür, daß das Alter der Hornhaut für das Einheilen und Klarbleiben des übertragenen Hornhautstückes nicht von entscheidender Bedeutung ist, denn bei Verwendung tagealter und frischer Hornhäute zeigen sich keine Unterschiede. Es ist eine interessante Aufgabe, mit modernen Analysemethoden der Frage nachzugehen, ob sich diese Erfahrungen bestätigen lassen oder nicht.

In den letzten Jahren haben sich unsere Kenntnisse vom chemischen Aufbau der Zelle und des Zellgewebes durch die Einführung chemisch und chemisch-physiologischer Untersuchungsmethoden erweitert. Auch die Frage nach dem Stoffwechsel der Zelle kann heute, vor allem nach Einführung des enzymatisch-optischen Testes (WARBURG, BÜCHER), weit eindeutiger beantwortet werden, als dies noch vor wenigen Jahren der Fall gewesen ist.

Unsere Fragestellung befaßt sich mit den Beziehungen zwischen Stoffwechselgeschehen und Eintrübung der Kaniinchenhornhaut. Zunächst sei ein grober Überblick über die bisherigen Untersuchungen der Cornea gegeben, auch wenn sie mit unserer Thematik nicht direkt zusammenhängen.

Der Wassergehalt der Hornhaut des Rindes schwankt zwischen 81 und 85 %, er nimmt mit steigendem Alter ab. (RAUEN)

Das Eiweiß der Hornhaut ist zum größten Teil wasserunlöslich. Drei Anteile wurden analysiert:

Kollagen	78,5 %
Mucoproteid	16,4 %
Elastin	2,5 %

Vom Kollagen gibt es keine genauen Untersuchungen, doch wird vermutet, daß die Aminosäure Hydroxyprolin, wie in anderen kollagenen Geweben auch hier charakteristisch ist.

Der Gesamtstickstoff der Hornhaut wurde mit 16,9 - 18,1 % bestimmt.

Die Eiweißstoffe der Cornea sind durch einen hohen Gehalt an Glykokoll und Glutaminsäure ausgezeichnet, wie aus folgender Aufstellung (SÜLLMANN) ersichtlich:

Aminosäuren im Gesamteiweiß der Cornea und Sklera des Menschen.

Glykokoll	18,0 g%	Threonin	2,8 g%
Valin	3,8 g%	Histidin	0,7 g%
Leucin	4,7 g%	Arginin	7,6 g%
Isoleucin	3,0 g%	Methionin	1,1 g%
Asparagin	7,4 g%	Lysin	3,8 g%
Glutaminsäure	11,0 g%	Phenylalanin	2,9 g%
Serin	4,3 g%	Tyrosin	1,4 g%

Papierchromatographische Untersuchungen zeigen, daß die Cornea die drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin in vergleichbaren Mengen wie die gallertige Substanz enthält (SCHAEFFER, MURRAY). KRAUSE fand einen Tryptophangehalt von 0,09 %.

Die Fraktionierung der Mucopolysaccharide ergab, daß die Polysaccharide Galactose, Glucosamin und Galactosamin aber keine Uronsäuren enthalten (WOODIN, ANSETH).

Stoffwechsel:

Die Glucose wird in der Hornhaut auf zwei Wegen abgebaut: auf dem einen erfolgt der Glucoseabbau bis zum Pyruvat, das dann entweder anaerob zu Lactat reduziert wird oder unter aeroben Bedingungen durch den Citronensäurecyclus zu CO_2 oxydiert wird. Die zweite Möglichkeit ist die direkte Oxydation der Glucose durch den Hexosemonophosphat-Shunt (KINOSHITA, MURRAY). Nach KINOSHITA werden 65 % der Glucose durch die Glycolyse abgebaut und 35 % über den direkten oxydativen Shunt.

Der Glucosegehalt der normalen Kaninchenhornhaut liegt nach WELKERS im Durchschnitt bei 5005 nmol/g Frischgewicht. SÖLLNER untersuchte die Kalberhornhaut und fand im Epithel einen Glucosegehalt von 3550 nmol/g Frischgewicht und im Stroma 890 nmol/g Frischgewicht Glucose. In der Kaninchenhornhaut bestimmten REIM und SCHMIDT im Epithel 3890 nmol/g Frischgewicht Glucose und im Stroma 3060 nmol/g Frischgewicht. Das Epithel hat also einen höheren Glucosegehalt als das Stroma.

Ein Teil der Glucose der Cornea wird in Glycogen umgewandelt (LALAI, REIM). HERRMANN und HICKMANN bestimmten den Glycogengehalt in Hornhäuten von Rindern und errechneten einen mittleren Wert von 0,2 - 0,4 mg/g Frischgewicht. Histochemische Befunde von CALMETTES deuten darauf hin, daß das Glycogen überwiegend im Epithel abgelagert wird.

Die Sauerstoffaufnahme der Cornea, ausgedrückt im Q_{O_2} , wurde mit 0,6 $\mu\text{l/h/mg}$ Trockengewicht beim Rind und 0,8 $\mu\text{l/h/mg}$ Trockengewicht beim Kaninchen angegeben (HERRMANN, HICKMANN, de ROETH, LANGHAM). Der Q_{O_2} des Epithels ist gegenüber dem des Stromas deutlich erhöht.

Versuche zur aeroben und anaeroben Glycolyse in der

Rinderhornhaut zeigen, daß die Umwandlung von Glucose zu Lactat in Abwesenheit von O_2 schneller abläuft als bei Anwesenheit von O_2 . Der normale Lactatgehalt in der Kälberhornhaut wird von LANGHAM mit $9,5 \mu\text{Mol/g}$ Frischgewebe angegeben. Nach Untersuchungen desselben Autors steigt die Lactatproduktion bei O_2 -Mangel an und beträgt etwa $22 \mu\text{Mol/h/g}$ Frischgewicht. Das Stroma produziert unter denselben Bedingungen mit $4,4 \mu\text{Mol/h/g}$ Frischgewicht weniger Lactat als das Epithel.

Bei Aufbewahrung der Hornhaut in feuchter Luft bei 37°C beträgt die Lactatproduktion $15,6 \mu\text{Mol/h/g}$ Frischgewicht, sie ist also geringer als in sauerstofffreier Umgebung.

Nach einer Theorie von HERRMANN und HICKMANN produziert das Epithel vermehrt Lactat, das im Stroma nicht verarbeitet werden kann und sich dort ansammelt.

Wichtige Aufschlüsse über die Funktion des Citronensäurecyclus geben die Substrate Malat und Citrat, die von KRAUSE und STACK bestimmt wurden. Verschiedene Enzyme des Citronensäurecyclus untersuchten KUHLMANN, REIM und SCHRAMM.

Über den Gehalt der Hornhaut an Mineralstoffen gibt SÜLLMANN folgende Tabelle an:

Kälber- hornhaut	K	Na	Mg	Ca	Cl	P	S	
	101	247	3	7	225	16	75	mg%

Die Hornhaut kann die Na-Salze und Methyl ester einiger Fettsäuren auf dem Wege der β -Oxydation verarbeiten, wie aus Versuchen von de BERARDINIS und de VINCENTIIS hervorgeht. Lipide sind nach HERRMANN und HICKMANN im Epithel höher konzentriert als im Stroma.

MORLEY und TOTH untersuchten die Kaninchenhornhaut mit der Keton-Methode und errechneten einen DPN-Gehalt für das Epithel von 0,96 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht und für das Stroma von 0,088 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht. Nach SIMONELLI beträgt der DPN- und der TPN-Gehalt der gesamten Hornhaut 0,015 $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht.

Angaben über den ATP-Gehalt der Rinderhornhaut finden wir bei HERRMANN und HICKMANN mit 11 μg für das Epithel und 4 μg für das Stroma (gemessen als "7 - Minuten - P").

Auf die Anwesenheit des Cytochromsystems in der Hornhaut weisen Arbeiten von HERRMANN und MCSIS hin. PAU konnte das Cytochrom - Cytochromoxydasesystem histochemisch sichtbar machen.

Enzymverteilungsmuster werden von DELLBRÜCK für die Rinder- und von REIM und SCHRALL für die Kaninchenhornhaut angegeben.

SULLMAN führt eine Tabelle an, aus der hervorgeht, daß eine Reihe von Stoffen im Epithel sehr viel höher konzentriert ist als im Stroma.

Cornea Kaninchen Rind	gesamt	Stroma	Epithel
GSH	21-29mg%	3-7mg%	78-178mg%
Ascorbinsäure	26-36mg%	16-17mg%	47-94mg%
Lactoflavin	0,18-0,54 γ/g		1,5-2,7 γ/g
Aneurin	3,3-4,6 γ/g	1,7-2,4 γ/g	26-42 γ/g
Acetylcholin	4-24 γ/g	0,3-0,5 γ/g	50-200 γ/g

Diese Übersicht soll einen kurzen Einblick in die bis heute angestellten Untersuchungen über die Hornhaut vermitteln. In dieser Arbeit soll auch die Frage nach der unterschiedlichen Stoffwechselaktivität im Epithel und Stroma unberücksichtigt bleiben. Das Problem der Differenzierung von Stroma und Epithel ^{wurde} in einer Arbeit von REIM und SCHMIDT bearbeitet.

Obwohl über das Hornhautgewebe viele Untersuchungen gemacht worden sind, liegt bis heute keine Arbeit vor, in der mit den modernen Methoden der optisch-enzymatischen Analyse der Frage nachgegangen wurde, ob ein Zusammenhang zwischen dem energieliefernden Stoffwechsel und der Eintrübung der Hornhaut nach ihrer Isolierung besteht.

Ein Verzeichnis der Abkürzungen findet sich im methodischen Anhang am Ende der Arbeit.

II. Fragestellung

Dem Energiestoffwechsel der Hornhaut wird immer wieder im Zusammenhang mit der Keratoplastik Aufmerksamkeit gewidmet. Aber auch für eine Zahl von Hornhauterkrankungen scheinen Kenntnisse über Stoffwechselvorgänge in der Hornhaut Bedeutung zu gewinnen. Dafür sprechen unter anderem Befunde von DARLEHNE und KLIM, die nach Anwendung verschiedener Medikamente biochemische Veränderungen in der Hornhaut feststellen konnten.

Seit den Untersuchungen von LANGHAM, TAYLER und HARRIS ist bekannt, daß Quellung und Trübung der Hornhaut erst auftreten, wenn der energieliefernde Stoffwechsel gestört ist. Da die Hornhaut nur selten unmittelbar post mortem für die Keratoplastik verwendet werden kann, ist es wichtig, zu wissen, wie lange und unter welchen Bedingungen eine isolierte Hornhaut klar bleibt und zu welchem Zeitpunkt die Stoffwechselveränderungen eintreten.

Diese Frage wurde zuletzt von SÖLLNER und HOCKWIN eingehend bearbeitet. In ihren Untersuchungen haben sie nach Veränderungen im Energiestoffwechsel gesucht, die über Stoffwechselvorgänge bei der Trübung der Hornhaut Aufschluß geben. Sie fanden in der getrübbten isolierten Hornhaut eine Abnahme der energiereichen Phosphate, besonders des ATP. Daneben lassen ihre Befunde Verschiebungen der Relationen der Adenosinphosphate erkennen. Den genauen zeitlichen Ablauf der Veränderungen der Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels indessen konnten SÖLLNER und HOCKWIN offenbar infolge von methodischen Schwierigkeiten nicht ermitteln.

Auch die wichtige Frage, ob die Metabolitgehalte in der frischen, noch nicht gelagerten Hornhaut unmittelbar post mortem den in vivo Verhältnissen wenigstens nahekommen,

ist bisher noch nicht zufriedenstellend beantwortet worden.

Die Messungen der Glycolyserate und der Atmungsgröße (de ROETH, LANGHAM, DELBRÜCK) vermitteln lediglich einen Einblick in die Stoffwechselbilanz. Aus diesem Grunde können nur Gehaltsbestimmungen einer möglichst großen Zahl von Metaboliten in verschiedenen Stadien der Hornhautalteration weiteren Einblick in die dynamischen Veränderungen des Energiestoffwechsels geben.

Die Analyse der energiereichen Phosphatverbindungen mit enzymatisch-optischen Methoden schien aussichtsreich, weil bei dieser der Arbeitsablauf kürzer und die Empfindlichkeit wesentlich größer ist, als bei dem säulenchromatographischen Verfahren, das SÖLLNER angewandt hat. Allerdings muß man dabei auf die Bestimmung der Uridin-, Guanosin- und Cytidinnucleotide verzichten. Dieses scheint zur Zeit noch vertretbar, da letztere nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen in ihrer Bedeutung für den Energiestoffwechsel weit hinter den Adenosinphosphaten zurückbleiben.

In dieser Arbeit wurden deshalb die Gehalte von Metaboliten des energieliefernden Stoffwechsels in der isolierten Hornhaut bestimmt. Die Analyse in allen Stadien der Lagerung und der Eintrübung sollte Veränderungen der einzelnen Metabolite sowie ihrer Relationen zueinander zeigen.

III. Methodischer Teil

1) Präparation der Hornhaut

Als Versuchstiere verwendeten wir Kaninchen, weil an ihnen in vivo Versuche leicht ausgeführt werden können. Die Tiere hatten ein Körpergewicht von 3 - 4 kg und gehörten zu einem in Marburg gezüchteten Wildstamm. Wir narkotisierten die Tiere mit 60 mg Nembutal i. v. (Pentobarbital-Na der Firma Abbott GmbH, Frankfurt) und zusätzlich mit 1,5 - 2,5 g Urethan in 20%iger Lösung i.v. Unter diesen Bedingungen wurden eine Excitation beim Einleiten der Narkose und gute Kreislaufverhältnisse erhalten. Für die normalen Hornhäute, die den in vivo Metabolitstatus wiedergeben sollten, eröffneten wir die Vorderkammer in situ nach Art eines cornealen Starschnittes und excidierten danach mit einer Schere die Hornhaut in etwa 1 mm Limbusabstand. Dabei wurde sehr darauf geachtet, daß keine stärkere Verformung der Hornhaut eintrat und daß mit der Pinzette keine Druckstellen am Rand der excidierten Hornhaut gesetzt wurden. Das Epithel blieb völlig unberührt. Die Hornhaut tauchten wir nach der Excision sofort in flüssigen Stickstoff, in dem sie in 5 - 10 Sekunden einfrohr.

2) Lagerung der Hornhaut

Nachdem wir herausgefunden hatten, daß die in vivo Metabolitgehalte der Hornhaut während der ersten 10 Minuten keine Veränderungen erfuhren, vereinfachten wir die Präparationstechnik für Lagerungsversuche. Die Tiere wurden mit einer i.v. Dosis von 0,5 g Evipan getötet.

Nach der Enukleation der Bulbi lösten wir die Conjunctiva im Bereich des Limbus von der Sklera ab. Die folgenden Aufnahmen sollen die Operations- und Präparationsmethode veranschaulichen.

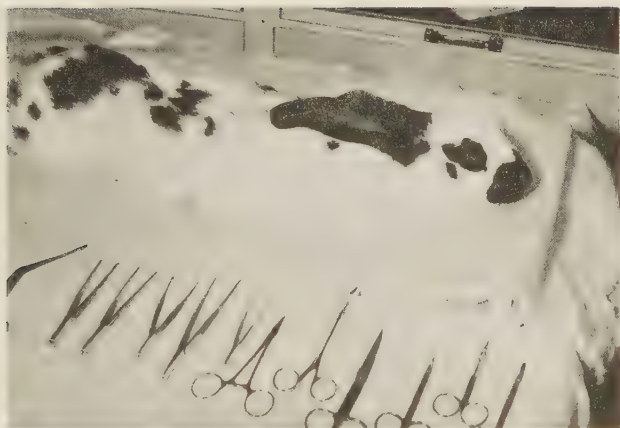


Abb.1 Kaninchen in Narkose

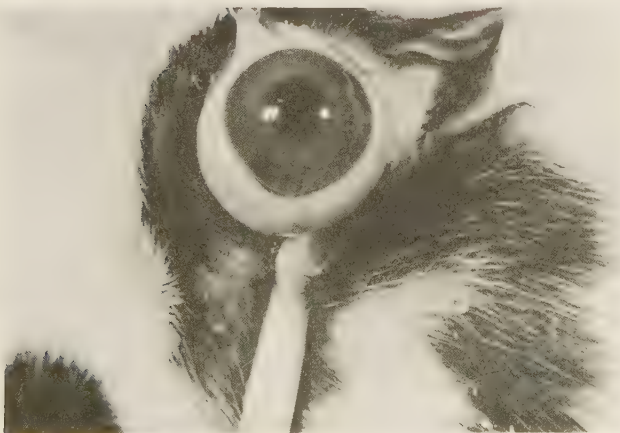


Abb.2 luxierter Bulbus

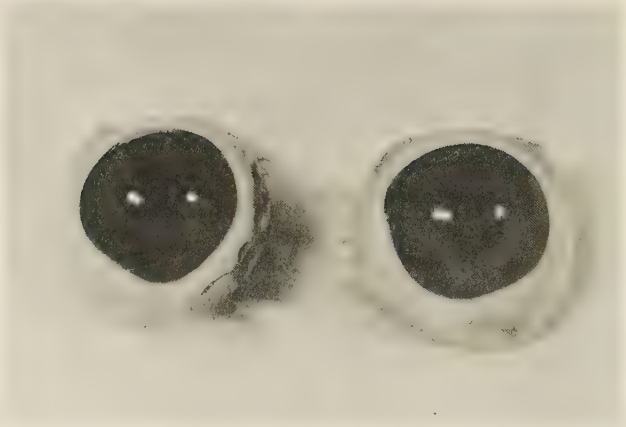


Abb.3 enukleierte Bulbi

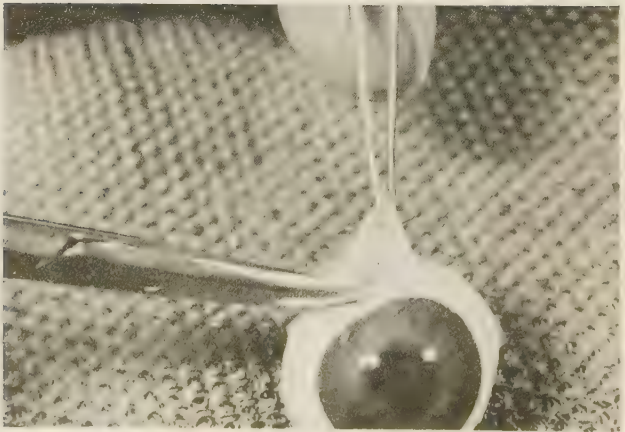


Abb.4 Trennung von Conjunctiva und Sklera

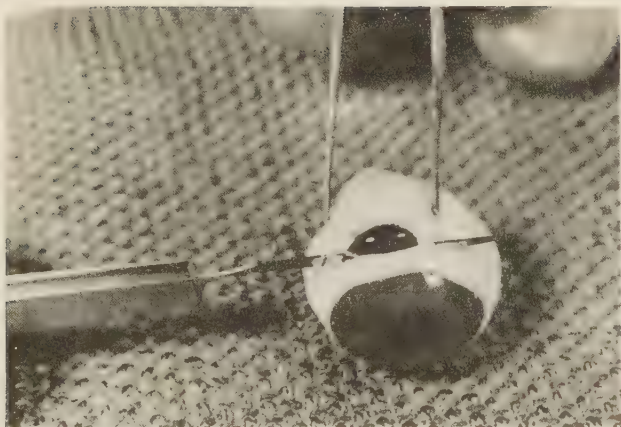


Abb.5 Präparation des Sklerafalzes

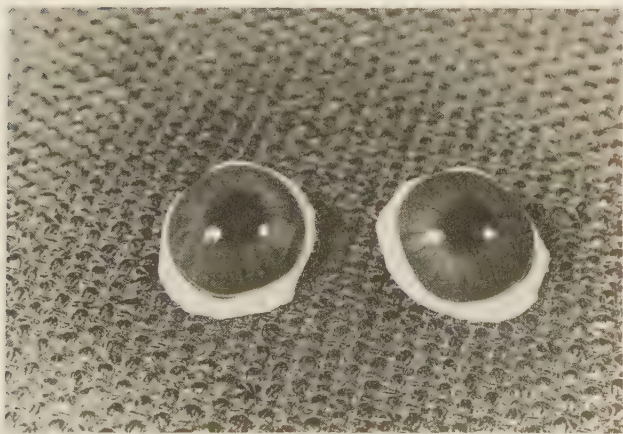


Abb.6 Hornhäute mit Sklerafalz



Abb. 7. Hornhaut
und Linse

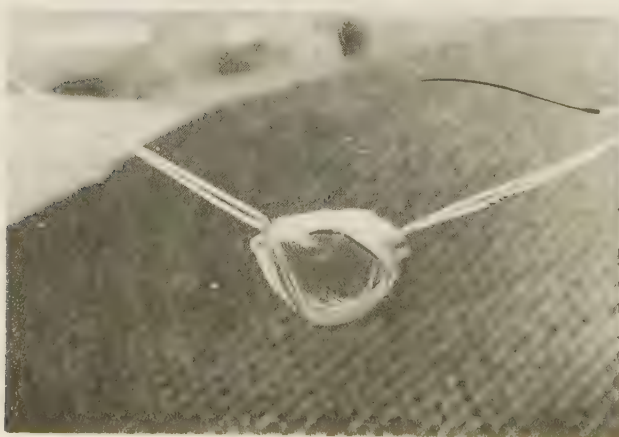


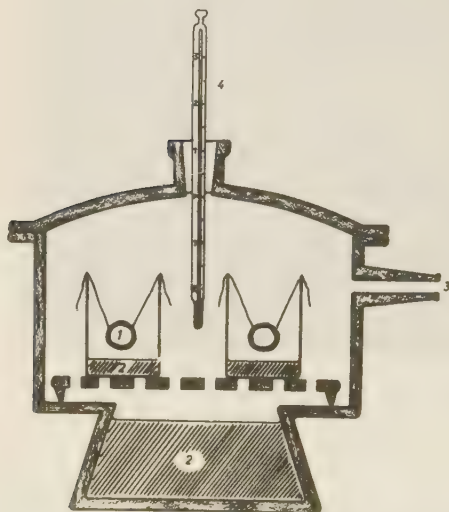
Abb. 8 Vorderansicht der "aufgehängten"
Hornhaut



Abb.9 Befestigung der Hornhaut
Ansicht von hinten

Zur Lagerung trennten wir die Hornhaut so aus dem Bulbus, daß ein Skleraring von etwa 1 mm Breite (Abb.5 und 6) bestehen blieb. Wir hatten vorher bei der Lagerung der isolierten Hornhaut eine rasche Trübung und Quellung der offenen Schnitttränder beobachtet, die nicht auftrat, wenn der Limbus erhalten blieb. Linse und Iris ließen sich leicht von der Hornhaut abziehen (Abb.7). Durch den freien Sklerarand der Hornhaut legten wir zwei Seidenfäden (Abb.8 und 9), an denen das Präparat freischwebend aufgehängt werden konnte. Eine Läsion der Hornhaut wurde sorgfältig vermieden.

Für die Lagerungsversuche haben wir einen WITTschen Topf zu einer feuchten Kammer umgebaut (Abb.10), in der die Temperatur nur zwischen 20 und 22°C schwankte.



Feuchte Kammer zur Lagerung der Hornhäute.

1. HORNHÄUTE
2. AQUA BIDESTALLATA UND WATTE
3. ZULEITUNG FÜR LUFT ODER CO_2
4. THERMOMETER

Abb.10

Um eine möglichst große Verdunstungsfläche zu erhalten, feuchteten wir Watte mit aqua bidest. an und legten damit den Boden des Topfes aus. Auf diese Weise wurden konstante Feuchtigkeitsverhältnisse erreicht. Durch eine Zuleitung wurde CO_2 bzw. Luft eingeleitet, eine andere diente zur Aufnahme des Thermometers. Wir lagerten die Hornhaut in dieser Kammer bis zu 116 Stunden.

3) Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe.

Zur weiteren Verarbeitung trennten wir den Sklerafalz von der Hornhaut in 1 mm Limbusabstand ab und fixierten den Gewebestoffwechsel durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff. Beide Hornhäute eines Tieres wurden gemeinsam extrahiert. Die hartgefrorenen Hornhäute zerkleinerten wir unter flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser und rührten sie sorgfältig in 3 ml eiskalte 0,5 n HClO_4 ein. Nach dem Wiegen wurde das zermörserte Gewebe 4 mal 15 Sekunden lang mit dem Ultraturrax (Firma Janke und Kunkel, Stauffen, Breisgau) homogenisiert. In Hostalenzentrifugenröhrchen wurde das Homogenisat in einer Laborzentrifuge mit Hochgeschwindigkeitsaufsatz ("Christ Universal Junior III"; Fa. Martin Christ, Osterode, Harz) 10 Minuten bei 20 000 mal g zentrifugiert. Um eine Erwärmung des Gewebes zu vermeiden, leiteten wir zur Kühlung Kohlensäureschnee im Strahl gegen den Rotor. Auf diese Weise wurde das Gewebe trotz der hohen Geschwindigkeit nur auf maximal $+4^\circ \text{C}$ erwärmt. Das Zentrifugat füllten wir in einen eisgekühlten Leßzylinder. Dann wurde der Rückstand in Zentrifugenröhrchen mit 1,5 ml 0,25 n HClO_4 nachextrahiert und wiederum zentrifugiert. Nach Ablesen des Extraktvolumens erfolgte die Neutralisation mit 10 n KOH im Eisbad auf pH 6,0 - 6,5 (mit Spezialindikatorpapier der Fa. Merck "getüpfelt"). Nach Abzentrifugieren des ausgefallenen KClO_4 wurde der fertige Extrakt in gekühlten Gläschen im Eiskasten zur Messung aufbewahrt.

4) Bestimmung der Metabolite im Extrakt und Berechnung der Einzelwerte

Die Analyse der Metabolitkonzentrationen führten wir nach den von HOHORST, KREUTZ und BÜCHER beschriebenen Methoden durch. Folgende Metabolite wurden in der Hornhaut analysiert: ATP, ADP, AMP, BTS, DAP, FDP, Lactat, α -GP, Malat, G-6-P und Glucose.

Zur Bestimmung der Substrate wandten wir den enzymatisch-optischen Test nach O. WARBURG an. Wir bedienten uns der Endwertmethode, d.h. wir registrierten den vollständigen Umsatz der zu messenden Metabolite. Die von HOHORST, KREUTZ, und BÜCHER angegebenen Testansätze wurden geringfügig geändert und lauteten im einzelnen:

I. L(-)-Malat, L(-)-Glycerin-1-phosphat und L(+)-Lactat.

Der kombinierte enzymatische Test beruht auf folgenden Reaktionen:

a) Reaktionen:

1. Malat + DPN^+ + Hydrazin $\xrightarrow{\text{MDH}}$ OAA + Hydrazon + $\text{DPNH} + \text{H}_3\text{O}^+$
2. G-1-P + DPN^+ + Hydrazin $\xrightarrow{\text{GDH}}$ DAP + Hydrazon + $\text{DPNH} + \text{H}_3\text{O}^+$
3. Lactat + DPN^+ + Hydrazin $\xrightarrow{\text{LDH}}$ BTS + Hydrazon + $\text{DPNH} + \text{H}_3\text{O}^+$

b) Reagenzien:

1. Hydrazin-Glykokoll-Puffer:

0,4 M Hydrazin-Sulfat, 1 M Glykokoll, 5 mM EDTA mit NaOH auf $\text{p}_\text{H} = 9,5$ eingestellt.

2. DPN-Lösung:

40 mg DPN (BOEHRINGER reinst) in 1 ml aqua bidest.

3. LDH-Lösung:

Lactatdehydrogenase (BOEHRINGER) wurde 1:2 mit aqua bi-dest. verdünnt.

4. MDH-Lösung:

Malatdehydrogenase (BOEHRINGER) wurde 1:4 mit aqua bi-dest. verdünnt.

5. GDH-Lösung:

α -Glycerinphosphatdehydrogenase (BOEHRINGER) wurde 1:4 mit aqua bidest. verdünnt.

c) Testzusammensetzung:

0,5 ml Extrakt
0,45 ml Hydrazinpuffer
0,05 ml DPN 40 mg/ml

Start: 0,01 ml MDH 1:4 (Malatbestimmung)

Start: 0,01 ml GDH 1:4 (α -Glycerophosphatbest.)

Start: 0,01 ml LDH 1:2 (Lactatbestimmung)

Die Extinktionsunterschiede wurden im Photometer EPIEN-DORF (Fa. Netheler & Hinz, Hamburg-Wellingsbüttel) mit Registriereinrichtung gemessen. Wellenlänge = 366 mμ, Schichtdicke d = 2 cm, Halbmikrocuvette, Spreizung 0 - 250, Spreizung beim Lactattest 0 - 100, Temperatur = 25°C durch Thermostat geregelt.

Wir verfolgten die Kinetik der Reaktionen 6 - 10 Minuten und starteten mit dem neuen Enzym, wenn die Reaktion ihren Endwert erreicht hatte.

d) Die Berechnung der Metabolitkonzentration

wurde nach folgender Formel ausgeführt:

$$\frac{\text{Mol}}{\text{g/frisch}} = \frac{\Delta E_{366} \cdot \text{Testvolumen} \cdot \text{Extraktvolumen}}{E \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen} \cdot \text{Gewebsgewicht}}$$

Der Extinktionskoeffizient $DPN/DPNH = 3,3 \cdot 10^6$
für $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ und $T = 25^\circ\text{C}$. (Nach HOHORST)

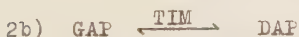
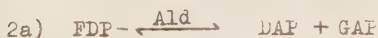
d = Schichtdicke

$$F = \frac{\text{Extraktvolumen}}{\text{Gewebsgewicht}}$$

$$\frac{\text{Mol}}{\text{g/frisch}} = \frac{\Delta E_{366} \cdot \text{Testvolumen} \cdot F}{3,3 \cdot 10^6 \cdot d \cdot \text{Einsatzvolumen}}$$

II. Dihydroxyacetonphosphat, Fructosediphosphat, Pyruvat.

a) Reaktion:



b) Reagenzien:

1) Triäthanol-amin/HCl-Puffer (Tris) 100 mM, $p_H = 7,6$
enthaltend 1 mM EDTA.

2) DPNH-Lösung:

DPNH(BOEHRINGER) 8 mg in 1 ml TRAP gelöst.

3) GDH-Lösung:

GDH(BOEHRINGER) 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

4) Ald/TIM-Lösung:

Aldolase(BOEHRINGER) und Triosephosphatisomerase(BOEHRINGER) 1:20 mit aqua bidest. verdünnt.

5) LDH-Lösung:

LDH(BOEHRINGER) 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

c) Testzusammensetzung:

1,0 ml TRAP, $p_H = 7,6$, m/10

1,0 ml Extrakt

0,005 ml DPNH 8 mg/ml

Start: 0,005 ml GDH 1:10

(DAP-Bestimmung)

Start: 0,005 ml Ald/TIM 1:20

(FDP-Bestimmung)

Start: 0,01 ml LDH 1:10

(Lyruvatbestimmung)

Messung bei 366 m μ , 25°C, d = 5, Halbmikroküvette.

III. Adenosintriphosphat, Glucose-6-phosphat.

a) Reaktion:

1) $ATP + Glucose \xrightarrow[Mg^{++}]{Hexokinase} Glucose-6phosphat + A-P$

2) $Glucose-6-phosphat + TPN^+ \xrightarrow{G-6-PDH} 6-Phosphogluconat + TPNH + H^+$

b) Reagenzien:

- 1) TRAP-Puffer (vgl. II b)
- 2) MgCl_2 100mM
- 3) TPN-Lösung:
20 mg TPN(BOEHRINGER) wurden in 1 ml aqua bidest. gelöst.
- 4) Zwischenferment-Lösung:
Zwischenferment(BOEHRINGER) wurde 1:2 mit aqua bidest. verdünnt.
- 5) Glucose-Lösung:
Glucose $3 \cdot 10^{-2}$ M in aqua bidest.
- 6) Hexokinase-Lösung:
Hexokinase(BOEHRINGER) 1:10 mit aqua bidest. verdünnt.

c) Testzusammensetzung:

- 0,5 ml Extrakt
0,5 ml TRAP, 100 mM, $p_H = 7,6$
0,01 ml MgCl_2 100 mM.
0,015 ml TPN 20 mg/ml

Start: 0,01 ml ZF 1:20 (G-6-P-Bestimmung)

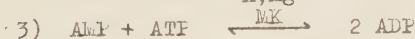
0,015 ml Glucose m/10

Start: 0,01 ml HK 1:10 (ATP-Bestimmung)

Messung bei 366 m μ , d = 2, Halbmikrocuvette, 25°C.

IV. Pyruvat, Adenosindiphosphat, Adenosinmonophosphat.

a) reaktion:



b) Reagenzien:

- 1) TRAP-Puffer (vgl. II. b)
- 2) DPNH-Lösung (vgl. II. b)
- 3) LDH-Lösung (vgl. II. b)
- 4) $MgCl_2$ -Lösung (vgl. III)
- 5) PEP-Lösung: PEP-CHA (Cyclohexylammoniumsalz des PEP) (BOEHRINGER) 15 mg in 1 ml aqua bidest.
- 6) Pyruvatkinase (BOEHRINGER) unverdünnt.
- 7) Myokinase-Lösung:
Myokinase (BOEHRINGER) 1:5 mit aqua bidest. verdünnt.

c) Testzusammensetzung:

0,5 ml Extrakt
0,5 ml TRAP, 100 mM, $p_H = 7,6$
0,015 ml DPNH 8 mg/ml

Start: 0,005 ml LDH 1:10 (BTS-Bestimmung)

0,01 ml $MgCl_2$ 100mM
0,01 ml PEP 15 mg/ml

Start: 0,001 ml (ADP-Bestimmung)

Start: 0,02 ml MK 1:5 (AMP-Bestimmung)

Messung bei 366 m μ , d = 2, Halbmikrocuvette, 25°C.

Die ADI-Messung erfolgte teilweise in doppeltem Testvolumen in der Halbmikrocuvette mit der Schichtdicke d = 5 cm.

V. Glucose

a) Reaktion:



b) Reagenzien:

- 1) TRAP-Puffer (vgl.II. b)
- 2) TPN-Lösung (vgl.III)
- 3) HgCl_2 100 mM
- 4) ATP-Lösung:
80 mg ATP (BOEHRINGER) gelöst in 1 ml aqua bidest.
- 5) Zwischenferment-Lösung:
ZF (BOEHRINGER) 1:20 mit aqua bidest. verdünnt.

c) Testzusammensetzung:

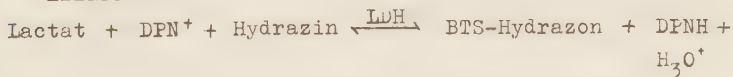
- 0,85 ml TRAP 100 mM, $p_H = 7,6$
0,1 ml Extrakt
0,015 ml TPN 20 mg/ml
0,01 ml HgCl_2 100 mM
0,005 ml ATP 80 mg/ml
0,01 ml ZF 1:20

Start: 0,01 ml HK 1:10 (Glucosebestimmung)

Messung bei 366 m μ , $d = 1$, 25°C.

VI. Lactat.

a) Reaktion:



b) Reagenzien:

- 1) Hydrazinpuffer (vgl.I.)
- 2) DPN-Lösung (vgl.I. b)
- 3) LDH-Lösung:
LDH (BOEHRINGER) 1:2 mit aqua bidest. verdünnt.
- 4) aqua bidestillata.

c) Testzusammensetzung:

0,45 ml Hydrazinpuffer

0,1 ml Extrakt

0,4 ml aqua bidest.

0,05 ml LPH 40 mg/ml

Start: 0,02 ml LDH 1:2 (Lactatbestimmung)

Messung bei 366 m μ , d = 1, 25°C.

Die oft sehr kleinen Mengen wurden mit sorgfältig gesäuberten 0,1 ml Enzymtest-lipetten pipettiert und mit Kunststoffstäbchen in die Cuvetten eingebracht. Auf diese Weise ließen sich die Enzymmengen ohne Verlust in die Testflüssigkeit einrühren.

Vom Beginn der Narkose bis zum Frierstop des in vivo Status der normalen Hornhaut vergingen höchstens 10 Minuten. Nach weiteren 15 Minuten war der Extrakt fertig. Wir begannen sofort mit der Bestimmung der Metabolitgehalte, die etwa 5 - 6 Stunden dauerten.

5) Trübungsmessung

Die mit bloßem Auge sichtbaren Veränderungen der Hornhaut protokollierten wir nach der folgenden Einteilung: klar

hauchzart getrübt

zarter Schleier

Trübung

starke Trübung (undurchsichtig).

Zur Registrierung der Trübung excidierten wir die Hornhaut mit Sklerafalz, wie oben beschrieben. Wir lagerten die Hornhaut in einer Glascuvette (OS), die als feuchte Kammer eingerichtet war und registrierten fortlaufend mit dem VIALAON-Photometer bei 545m μ die Zunahme der Extinktion. Zur Trübungsmessung in CO₂-Atmosphäre leiteten wir CO₂ in die Glascuvette ein und verschlossen sie mit dem Originaldeckel. Durch wiederholte Proben mit einem

glühenden Holzspan überzeugten wir uns davon, daß sich die CO_2 -Atmosphäre hielt.

Die von uns angewandte Technik der Trübungsmessung ist nur bedingt verwertbar, weil keine randständigen Trübungen, sondern nur ein relativ kleiner zentraler Bezirk der Hornhaut vom messenden Lichtstrahl erfaßt wird. Zum Vergleich führten wir deshalb weitere Messungen nach dem Prinzip der Nephelometrie mit Hilfe der entsprechenden Einrichtung des VITARKON-Photometers aus und erhielten ganz ähnliche Kurvenabläufe, wie bei durchfallendem Licht

6) Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse:

Alle normalen Hornhäute wurden unter denselben Versuchsbedingungen untersucht. Die Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und der Abweichung des Mittelwertes erfolgte nach den hier wiedergegebenen Formeln:

I. Summe der Einzelwerte $x = S(x)$

II. Summe der Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert $S(x-M)$

III. Summe der Abweichungen im Quadrat $S(x-M)^2$

IV. Summe der Einzelwerte im Quadrat $S(x^2)$

Wenn n die Zahl der Einzelwerte ist, dann ist der

Mittelwert $M = S(x) : n$

Die Streuung ist $s^2 = \frac{S(x^2) - M \cdot S(x)}{n - 1}$

Die Standardabweichung errechnet sich aus der Quadratwurzel der Streuung s^2

$$s = \sqrt{\frac{S(x^2) - M \cdot S(x)}{n - 1}}$$

Die Streuung des Mittelwertes der Stichproben wird bestimmt nach:

$$s_{\text{L}}^2 = \frac{1}{n} s^2$$

und die Standardabweichung der Mittelwerte nach:

$$s_M = \frac{1}{\sqrt{n}} s$$

Für die Hornhäute, die in Luft und CO_2 gelagert hatten, wurde das Steigungsmaß b = Regressionskoeffizient und der Korrelationskoeffizient r für die Quotienten L/P und ATP/ADP nach folgender Formel berechnet:

$$L/P = x \quad \text{ATP/ADP} = y$$

I. Summe der Einzelwerte x und y = $S_{(x)}$ und $S_{(y)}$

II. Summe der Einzelwerte im Quadrat = $S_{(x^2)}$ und $S_{(y^2)}$

III. Summe der Produkte der Einzelwerte = $S_{(xy)}$

IV. Mittelwerte für $M_{(x)}$ und $M_{(y)}$

$$\text{Die Doppelstreuung} = s_{(xy)} = \frac{S_{(xy)} - M_{(y)} S_{(x)}}{n - 1}$$

$$\text{Die Streuung von } x = s^2_{(x)} = \frac{S_{(x^2)} - M_{(x)} S_{(x)}}{n - 1}$$

Der Regressionskoeffizient

$$b = \frac{s_{(xy)}}{s^2_{(x)}} = \frac{S_{(xy)} - M_{(y)} S_{(x)}}{S_{(x^2)} - M_{(x)} S_{(x)}}$$

Der Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{s_{(xy)}}{\sqrt{s^2_{(x)} s^2_{(y)}}} \quad r = \frac{s_{(xy)}}{s_{(x)} s_{(y)}}$$

Die Steigungsgleichung für die Regressionsgerade lautet:

$$\bar{y} = a + b\bar{x}$$

a = Interzept auf der y -Achse

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

b = Tangens des Steigungswinkels β

= Steigungsmaß der Geraden

Prüfung der Signifikanz eines Regressionskoeffizienten:

a) Regressionskoeffizient b :

$$S_{(y-y)^2} = S_{(y^2)} - M_{(y)} \cdot S_{(y)} - b^2 [S_{(x^2)} - M_{(x)} S_{(x)}]$$

$$s^2_{(y^2)} = \frac{S_{(y-y)^2}}{n - 2}$$

$$s_{(Y)} = \sqrt{\frac{s_{(Y-Y)}^2}{n-2}}$$

$$s_b = \frac{s_{(Y)}}{\sqrt{s_{(x)}^2 - M_{(x)} s_{(x)}}}$$

$$t = \frac{b}{s_b}$$

b) Korrelationskoeffizient r:

$$s_r = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

$$t = \frac{r}{s_r}$$

Die Wahrscheinlichkeit P zur Abweichung t läßt sich aus der Zusammenstellung in den GLIGY-Tabellen 1955 ermitteln.

P gibt an, in wieviel Prozent der Fälle die Wahrscheinlichkeit besteht, daß die gefundene mittlere Differenz zwischen den beiden zu vergleichenden Werten im Bereich der Streuung liegt.

Nach der geltenden Übereinkunft sind die Werte für P , die kleiner sind als 0,05 statistisch signifikant, d.h. es besteht nur zu 5% die Wahrscheinlichkeit, daß die Differenz der Mittelwerte durch die Streuung der Einzelwerte erklärt werden kann.

IV. ERGEBNISSE:

1. Die Metabolite der normalen Hornhaut in vivo.

Die Metabolitgehalte der normalen Hornhaut sind in Tabelle 1 aufgeführt und in Abbildung 1 in Form eines Metabolitmusters graphisch dargestellt. Die Standardabweichungen der Mittelwerte liegen zwischen 5 und 10 %.

Die extracellulär vorkommenden Metabolite wie Lactat, Pyruvat und Glucose weisen höhere Werte auf, als die rein intracellulären Substrate ATP, ADP, AMP, Malat, α -GP, DAP, G-6-P und FDP.

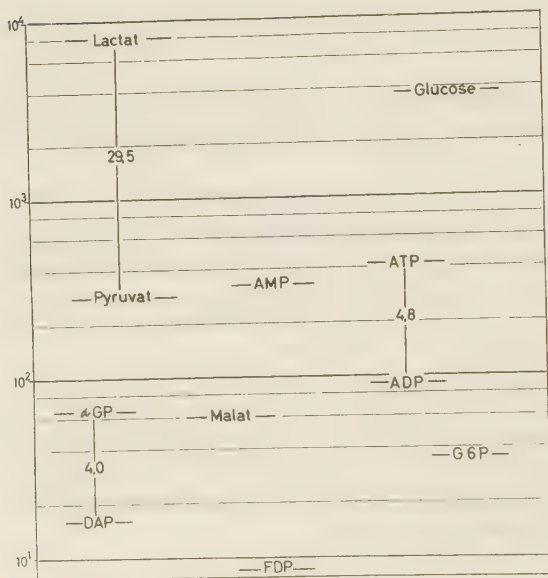


Abb.1 Metabolitmuster der Kaninchenhornhaut in vivo
Logarithmische Darstellung der Metabolitgehalte in der Hornhaut in nMol/g Frischgewebe.

Die Bestimmung der Hexose und Triosephosphate konnte nicht in allen Versuchen ausgeführt werden, weil die dafür nötigen größeren Extraktmengen (1ml) nicht immer verfügbar waren. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Metabolitbestimmungen darf nicht vergessen werden, daß es sich um eine Analyse der gesamten Hornhaut handelt, bei der keine Differenzierung zwischen Epithel, Stroma und Endothel vorgenommen wurde.

Tabelle 1

Metabolitgehalte der normalen Hornhaut von Kaninchen in vivo.

Mittelwerte $\bar{M}$ und Standardabweichung der Mittelwerte $S_{\bar{M}}$ in nmol/g Frischgewebe (10^{-9} Mol.)

Metabolit	n	$\bar{M}$	$S_{\bar{M}}$	Vergleichswerte der Literatur
Lactat	14	7644,0	301,0	8560 1)
Pyruvat	15	278,0	7,5	
L/P	15	29,5	1,1	
1GP	13	64,8	5,5	
DAF	5	15,4	4,4	
G/D	4	4,0	1,6	
Malat	12	60,0	4,2	
G-6P	7	34,6	5,4	
FDP	14	8,7	1,1	
Glucose	12	3732,0	214,5	4650 5)
ATP	16	418,0	22,5	Rind 225 2) 300 4) Schwein 169 3)
ADP	16	88,9	6,2	Rind 163 2) Schwein 79 3)
AMP	15	316,9	27,8	Rind 150 2) Schwein 58 3)
ATP/ADP	16	4,8	0,2	Rind 1,38 2) 2,74 4) Schwein 2,13 3)
AD	15	826,4	58,9	Rind 538 2) Schwein 306 2)

1) MOSLEY, N.H., A. TOTH

2) SÖLLNER, F. 1963

3) SÖLLNER, F. und O. HOCKWIN, 1964

4) berechnet nach Werten von BERGMANN, H. und MICKLAH, F.

5) JELKERS

2. Veränderung der Metabolite nach Lagerung in Luft und ihre Beziehung zur Trübung.

Die ersten sichtbaren Veränderungen der isolierten Hornhaut während der Lagerung bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ}\text{C}$) in einer feuchten Kammer, zu der die Außenluft Zutritt hatte, waren nach 30 Stunden zu erkennen. Es erschien in den peripheren Abschnitten ein zarter Trübungsschleier. Nach 46 Stunden war die ganze Hornhaut zart verschleiert. Von da ab ging die weitere Eintrübung der isolierten Cornea schneller vor sich. Bereits nach 54 Stunden trat eine periphere Trübung ein, die sich nach 64 Stunden Lagerung so weit ausgedehnt hatte, daß die ganze Hornhaut leicht getrübt, aber noch durchsichtig war. 82 Stunden nach der Excision aus dem Bulbus erschien die Hornhaut milchig, matt und undurchsichtig. Diese Veränderungen der optischen Eigenschaften der Hornhaut wurden durch die Extinktionsmessung objektiv und fortlaufend aufgezeichnet. (Abb. 2 - 4, gestrichelte Linie). Die Extinktion der gerade isolierten, klaren Hornhaut lag zu Beginn des Versuches bei 0,600 Extinktionseinheiten ($\log \frac{1}{I}^0$). Während der ersten 20 Stunden wurde die Lichtabsorption um 0,100 Extinktionseinheiten geringer. Dann stieg die Trübungskurve mit zunehmender Dauer der Lagerung zuerst flach, dann steiler werdend, um nach 78 Stunden auf höherem Niveau flach auszulaufen. Der gesamte Anstieg der Extinktion bis zu vollständiger Trübung der Hornhaut betrug 0,880 (von 0,600 - 0,500 - 1,380) Extinktionseinheiten.

Die Einzelergebnisse der Metabolitbestimmungen sind der Tabelle 3 im methodischen Anhang zu entnehmen. Die folgende Abbildung 2 zeigt die Veränderungen der energiereichen Phosphate ATP, ADP und AMP während der Isolierung in Außenluft.

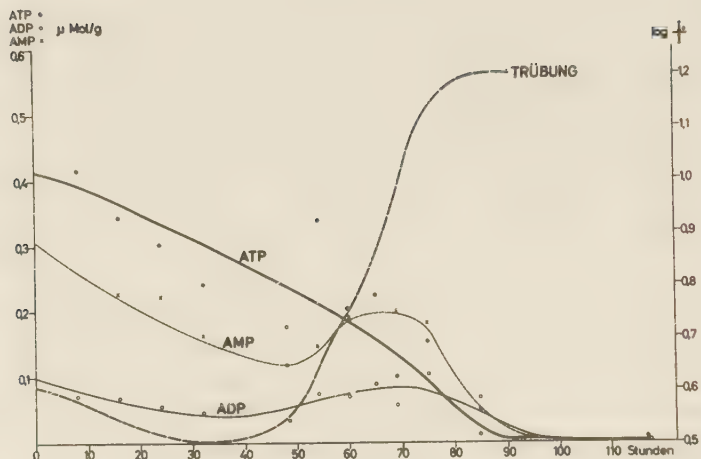


Abb.2 Das Verhalten von ATP, ADP und AMP nach Isolierung der Hornhaut und Aufbewahrung in Außenluft und die Trübungskurve der Hornhaut unter denselben Bedingungen. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalte in $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log \frac{I_0}{I}$. ATP: ——— ADP: AMP: - - - - - Trübungskurve: - . - . -

ATP und AMP fallen zunächst kontinuierlich ab und sind nach 95 Stunden nicht mehr nachweisbar. Der ADP-Gehalt bleibt am Anfang der Versuchsreihe fast konstant, um erst gegen Ende der Lagerungsperiode zugleich mit den beiden Reaktionspartnern unter die Grenze der Nachweisbarkeit abzusinken. Der AMP-Gehalt steigt zwischen 50 und 70 Stunden noch einmal kurz an; dieser kurze Anstieg fällt in die Periode, in der die Trübung der Hornhaut stark zunimmt.

Auch die Lactat- und Pyruvatgehalte (Abb.3) nehmen in der isolierten Hornhaut beständig ab. Die Kurven laufen annähernd geradlinig und fast parallel, sodaß die Lactat/Pyruvat-Quotienten (L/P) lange Zeit konstant bleiben. Beide Metabolite waren nach Lagerung der isolierten Hornhaut über 120 Stunden nicht mehr nachweisbar.

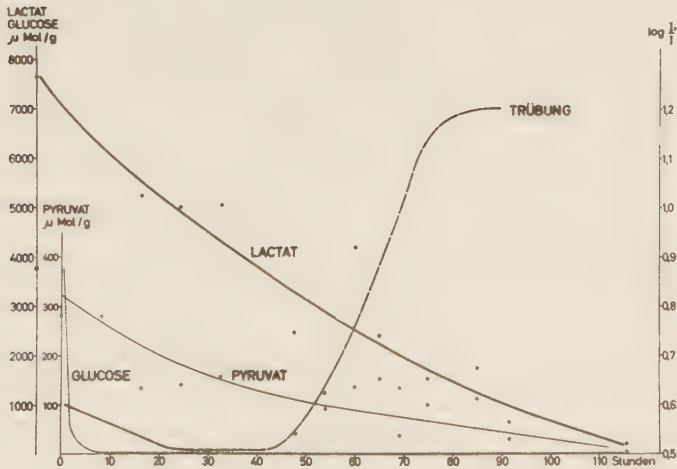


Abb.3 Das Verhalten von Lactat, Pyruvat und Glucose nach Isolierung der Hornhaut und Aufbewahrung in Außenluft und die Trübungskurve der Hornhaut unter denselben Bedingungen. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalte in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log \frac{I_0}{I}$. Lactat: ——— Pyruvat: - - - - - Glucose: Trübungskurve: - . - . -

Wie aus den Abbildungen 3 und 4 hervorgeht, sinkt der Glucosegehalt der isolierten Hornhaut schon nach 30 Minuten auf so niedrige Werte ab, daß er nicht mehr nachgewiesen werden kann. (Vgl. Einzelbestimmungen, Tabelle 3, Seite 53)

Besonders auffallend ist die Beziehung zwischen dem ATP/ADP-Quotienten und dem Verlauf der Trübungskurve der Hornhaut. (Abb.4) Während der ersten Periode der Lagerung bleibt der ATP/ADP-Quotient konstant und genau so hoch, wie wir ihn in der normalen, im in vivo Status analysierten Hornhaut gefunden haben. Zu dieser Zeit ist die Hornhaut noch völlig klar, die Lichtabsorption bei der photometrischen Messung wird sogar noch geringer. Erst mit dem Anstieg der Trübungskurve nach etwa 40 Stunden sinkt der ATP/ADP-Quotient ab. Dieser Abfall des ATP/ADP-Quotienten fällt zeitlich ziemlich genau mit der Eintrübung der Hornhaut zusammen. Bei vollständiger Trübung der Hornhaut nähern sich die ATP/ADP-Quotienten dem Nullpunkt. Zur gleichen Zeit sinken die Gehalte aller gemessenen Metabolite unter die Grenze der Nachweisbarkeit. (Abb.2,3 und 4).

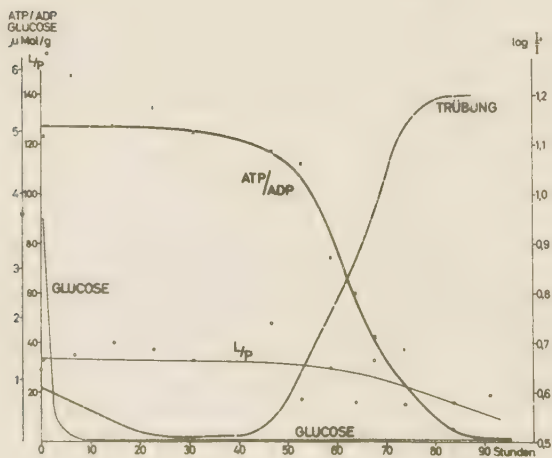


Abb.4 Das Verhalten ATP/ADP-Quotienten, L/P-Quotienten und Glucose zur Trübung der Hornhaut nach Isolierung und Aufbewahrung in Außenluft. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalte in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log I_0$. ATP/ADP: ——— L/P: ——— Glucose: - - - - -
I Trübungskurve: ———

3. Die Veränderung der Metabolite nach Lagerung in CO₂-Atmosphäre und ihre Beziehung zur Trübung.

Die Hornhäute wurden unter denselben Bedingungen gelagert wie in der Versuchsreihe mit Luft. Die Zimmertemperatur schwankte auch hier zwischen 20 und 22°C. Die Trübung wurde wiederum nach Sicht und mit dem VITATRON-Photometer registriert und verlief in den gleichen Stadien wie bei den Lagerungsversuchen in Luft. Die Trübungskurven wurden in die Abbildungen 5 bis 7 gestrichelt eingezeichnet. Aus diesen Darstellungen geht, wenn man den veränderten Zeitmaßstab auf der Abszisse beachtet, deutlich hervor, daß die Eintrübung gleich in den ersten Stunden der Versuchsreihe sehr schnell eintritt. Schon nach zwei Stunden konnte man eine periphere Trübung erkennen. Nach dreistündiger Aufbewahrung hatte sich die Trübung über die gesamte Hornhaut ausgedehnt. Die weiteren Veränderungen gingen schnell vor sich und nach 6 Stunden war die Hornhaut milchig, trüb und undurchsichtig.

Die photometrische Registrierung der Trübung unter Verwendung eines Filters von 624 m μ ergab folgende Extinktionsunterschiede. Die Extinktion der frisch präparierten Hornhäute lag anfangs bei 0,560 Extinktionseinheiten ($\log \frac{I_0}{I}$). Sofort nach Versuchsbeginn stieg die Extinktion sehr steil an, d.h. die Hornhäute wurden zunehmend trüber. Bei 1,220 Extinktionseinheiten erreichten die Hornhäute das Maximum ihrer Eintrübung. Der gesamte Anstieg der Trübungskurve betrug bei den Hornhäuten in CO₂-Atmosphäre 0,660 Extinktionseinheiten.

Die Ergebnisse der Metabolitbestimmungen sind im einzelnen in der Tabelle 4 (methodischer Anhang) aufgezeichnet. Abbildung 5 zeigt das Verhalten der Adenosinphosphate ATP, ADP und AMP und den Verlauf der Trübungskurve der Hornhaut während 25-stündiger Lagerung in CO_2 -Atmosphäre.

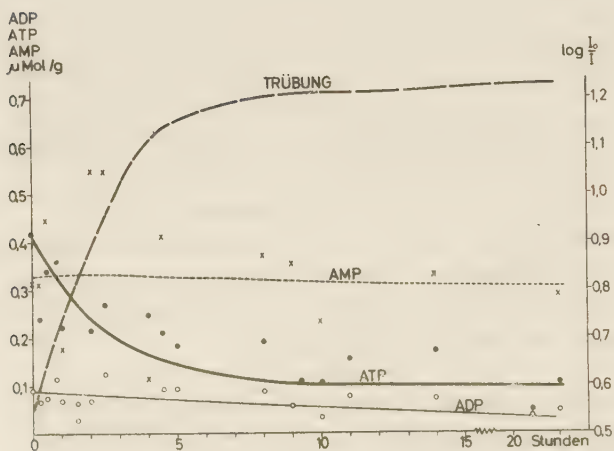


Abb.5 Das Verhalten von ATP, ADP und AMP nach Isolierung der Hornhaut und Aufbewahrung in CO_2 -Atmosphäre, und die Trübungskurve der Hornhaut unter denselben Bedingungen. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalte in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log \frac{I_0}{I}$.
 ATP: ——— ADP: ——— AMP: - - - - -
 Trübungskurve: ———

Die Gehalte von ATP, ADP und AMP fallen, wie aus den Kurven ersichtlich ist, auch bei den Versuchen in CO_2 -Atmosphäre ab. Die energiereichste Stufe der Adenosinphosphate, das ATP zeigt auch hier den steilsten Abfall, der ADP- und AMP-Abfall erfolgt verzögert. Man kann den Kurven entnehmen, dass der ADP- und AMP-Gehalt bei unseren Versuchsbedingungen längere Zeit unverändert bleibt als das ATP. Die Abbildung zeigt deutlich, wie eng der ATP-Abfall und die Zunahme der Trübung gekoppelt sind.

Die Lactat-, Pyruvat- und Glucosegehalte der isolierten und in CO_2 -Atmosphäre gelagerten Hornhäute sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt. Einzelergebnisse finden sich in Tabelle 4 (methodischer Anhang).

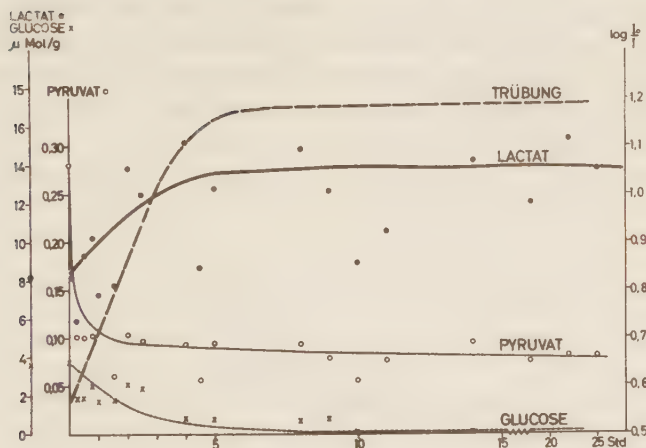


Abb.6 Das Verhalten von Lactat, Pyruvat und Glucose in der isolierten und in CO_2 -Atmosphäre aufbewahrten Hornhaut und die Beziehung zur Trübungskurve der Hornhaut. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalte in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log I_0$.
 Lactat: ———— Pyruvat: ————
 Glucose: - - - - - Trübungskurve: — · — · —

Der Lactatgehalt der in CO_2 -Atmosphäre aufbewahrten Hornhaut nimmt schnell zu. Nach 5 bis 6 Stunden erreicht er das Doppelte seines Normalwertes. Nach Erreichen dieses Wertes läuft die Kurve flach aus, der Lactatgehalt steigt langsamer als zu Versuchsbeginn.

Der Pyruvatgehalt verhält sich gegensätzlich. Er fällt bereits in den ersten beiden Stunden sehr stark ab, und zwar steiler, als der Lactatgehalt ansteigt. Nach 2 bis 3 Stunden ist der Pyruvatgehalt um etwa ein Drittel vermindert. Nach diesem starken Pyruvatverlust hält das Hornhautgewebe das Pyruvat längere Zeit fest, um es ganz allmählich abzugeben.

Die Glucose (Abb.6 und 7) ist nach 10 Stunden in der Hornhaut nicht mehr nachweisbar, sie verschwindet als erster Metabolit völlig aus dem Gewebe. Der Glucoseabfall erfolgt zeitlich in demselben Verhältnis, wie der Lactatanstieg.

Die Alteration des Hornhautgewebes wird deutlich in dem Verhalten des ATP/ADP-Quotienten und L/P-Quotienten. In der Abbildung 7 sind diese beiden Quotienten, ihr Verhältnis zur Trübungskurve und der Glucosegehalt in den Einzelstadien der Versuchsreihe dargestellt. Die Einzelwerte sind in Tabelle 4, Seite 54 angegeben.

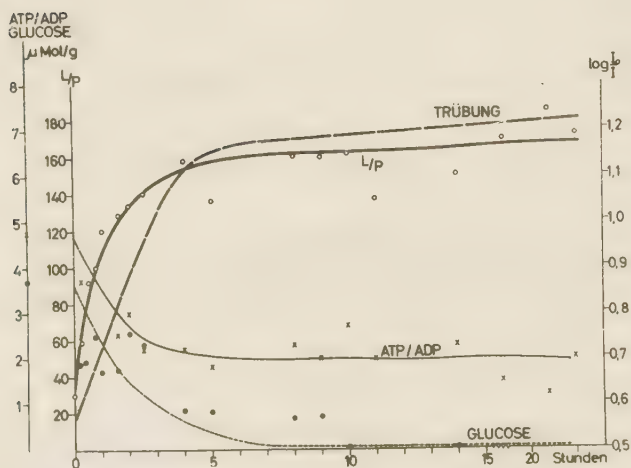


Abb.7 Das Verhalten von ATP/ADP-, L/P-Quotienten und Glucosegehalt der isolierten und in CO_2 -Atmosphäre aufbewahrten Hornhaut und die Beziehung zur Trübungskurve der Hornhaut. Abszisse: Versuchsdauer in Stunden. Linke Ordinate: Metabolitgehalt in $\mu\text{Mol/g}$ frischgewogen, ATP/ADP- und L/P-Quotienten. Rechte Ordinate: Extinktionseinheiten $\log \frac{I_0}{I}$. ATP/ADP-Quotient: ——— L/P-Quotient: ——— Glucose: - - - - - Trübungskurve: - - - - -

Der ATP/ADP-Quotient fällt in den ersten 5 Stunden der Lagerung von seinem Normalwert 4.8 auf 2.0 ab und läuft

dann allmählich aus. Der L/I-Quotient steigt im zeitlich gleichen Verhältnis auf das 5-fache an und nimmt in den nächsten 20 Stunden unserer Versuchsreihe nicht mehr in dem Maße zu, wie zu Versuchsbeginn.

Die Trübungskurve der in CO_2 gelagerten Hornhaut zeigt von Anfang an einen andersartigen Verlauf, als die der in Luft aufbewahrten Hornhaut. Die Trübungskurve steigt gleich zu Versuchsbeginn sehr steil an und erreicht schon nach 5 Stunden ihren höchsten Wert. In diesen Versuchen wird erneut die Beziehung zwischen dem Anstieg der Trübungskurve und dem Abfall des ATP/ADP-Quotienten deutlich. Das Absinken des ATP/ADP-Quotienten bewirkt eine Eintrübung der Hornhaut und einen Anstieg der Trübungskurve.

Der Abfall des ATP/ADP-Quotienten in der Hornhaut nach Lagerung in CO_2 -Atmosphäre geht mit dem Anstieg des Redoxquotienten L/P einher. Der Ablauf dieser Veränderungen läßt einen linearen Zusammenhang zwischen diesen Größen vermuten. Die Beziehung wird durch die Regressionsgerade beschrieben, deren Formel nach der im statistischen Teil angegebenen Methode errechnet wurde (vgl. Seite 26)

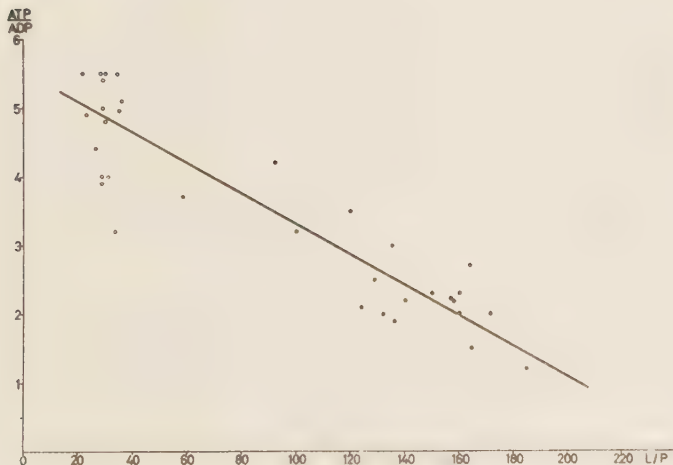


Abb.8 Regressionsgerade der ATP/ADP- und L/P-quotienten
Ordinate: ATP/ADP-Quotienten, Abszisse: L/P-Quotienten.

Die Festigkeit der Beziehungen wird durch den Korrelationsquotienten r angezeigt. Dieser ist nach unserer Berechnung statistisch signifikant von Null unterschieden.

Um unsere Ansicht zu unterstützen, daß in der Hornhaut beim Übergang vom normalen Stoffwechsel zur Anaerobiose eine Beziehung zwischen den Quotienten L/P und ATP/ADP besteht, errechneten wir die Regressions- und Korrelationskoeffizienten einmal nur für die in CO_2 gelagerten Hornhäute und zum anderen zusammen mit den Normalwerten der Hornhäute (Tabelle 2, Seite 52).

Wir fanden folgende Werte:

Regression	$\frac{ATP}{ADP}$	:	$\frac{L}{P}$	$b = -0,02038 \pm 0,03407$
				$r = -0,8081 \pm 0,143$
(ohne Normalwerte)				$a = 5,391$

Regression	$\frac{ATP}{ADP}$	:	$\frac{L}{P}$	$b = -0,02217 \pm 0,00024$
				$r = 0,9573 \pm 0,051$
(mit Normalwerten)				$a = 5,534$

V. Diskussion

Die Anwendung von enzymatisch-optischen Methoden machte es möglich, im Extrakt der Hornhaut des Kaninchens 11 Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels zu bestimmen. (Tabelle 1, Seite 29).

Neben den in vivo Gehalten der normalen Hornhaut untersuchten wir auch isolierte Hornhäute nach Lagerung in CO_2 -Atmosphäre und Luft. Wir beobachteten die verschiedenen Stadien der Eintrübung mit bloßem Auge und registrierten sie objektiv mit dem Photometer. Der zeitliche Ablauf der Hornhauttrübung wurde in CO_2 -Atmosphäre 15 Stunden und bei Lagerung in Luft 120 Stunden registriert.

Im einzelnen zeigte sich folgendes:

- 1) In Gegenwart von Luftsauerstoff nimmt der Glucosegehalt der isolierten Hornhaut sehr schnell ab, und ist schon nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar. Bei Aufbewahrung der Hornhaut in CO_2 -Atmosphäre ist die Glucose erst nach 10 Stunden ganz aus dem Gewebe verschwunden.
- 2) Der Lactat- und Pyruvatgehalt der Hornhaut fällt in Gegenwart von O_2 kontinuierlich ab. Nach etwa 120 Stunden sind beide Metabolite soweit abgesunken, daß sie nicht mehr nachzuweisen sind. Nach Verdrängung des Luftsauerstoffs durch CO_2 fällt das Pyruvat in den ersten beiden Stunden unserer Versuchsreihe sehr steil ab und beträgt nach 5 Stunden nur noch ein Drittel des Normalwertes. Der Lactatgehalt steigt im Gegensatz zum Pyruvat langsamer an, und erreicht nach etwa 5 Stunden ein Niveau, das sich in den nächsten 20 Stunden nur wenig verändert.
- 3) Die energiereichen Phosphatverbindungen ATP und ADP sinken in beiden Versuchsreihen parallel zur Hornhauttrübung. In der CO_2 -Atmosphäre beginnt der Abfall des

ATP sofort nach Versuchsbeginn, in der Luft erst nach 10 Stunden. Der ADP-Gehalt fällt in beiden Versuchsreihen nicht so schnell ab wie das ATP. Das AMP verhält sich unterschiedlich. In der Luft fällt es parallel mit seinen beiden Reaktionspartnern ab, nimmt aber nach 50 bis 60 Stunden noch einmal zu. In der CO_2 -Umgebung bleibt der AMP-Gehalt des Gewebes im Mittel über lange Zeit konstant.

4) Die L/P-Quotienten zeigen während der ersten 60 Stunden unseres Versuches in Luft keine Veränderungen. Erst nach dieser Zeit fallen sie allmählich ab und erreichen nach etwa 100 Stunden den Nullpunkt. In der CO_2 -Umgebung steigen sie dagegen an und erreichen schon nach 5 Stunden ihr Maximum.

5) Die ATP/ADP-Quotienten verhalten sich in beiden Versuchsreihen gleich. Solange die Hornhaut klar bleibt, ändern sie sich wenig und fallen erst dann steil ab, wenn die Lintrübung beginnt. In der CO_2 -Atmosphäre beginnt dieser Abfall sofort und ist nach etwa 5 Stunden abgeschlossen, in der Luftumgebung spielen sich diese Veränderungen erst nach 50 - 60 Stunden ab.

Durch Fixierung des Gewebsstoffwechsels in flüssigem Stickstoff und durch ein schonendes Extraktionsverfahren wurden Verfälschungen der in vivo Gehalte durch präparatorische Maßnahmen weitgehend vermieden. Der zeitliche Ablauf der Änderungen der Metabolitgehalte bei den Lagerungsversuchen der isolierten Hornhaut stützt die Ansicht, daß es sich bei den Analysen der frischen Hornhaut um in vivo Gehalte handelt. Folgt man nämlich diesen Verlaufskurven (Abb. 3 - 7) rückwärts nach der Zeit $t = 0$, so gelangt man im Schnittpunkt mit der Ordinate zu den Werten, die den in vivo Gehalten der Hornhaut entsprechen. (Wir haben die Mittelwerte der in vivo Konzentrationen als verstärkte Zeichen auf die Ordinate eingetragen).

Diese Schätzung stimmt mit unseren Analysen der frischen Hornhaut überein. Man kann daraus folgern, daß die Ergebnisse in Tabelle 1 mindestens für ATP, ADP, AMP, Lactat, Pyruvat und Glucose den wahren in vivo Gehalten der Hornhaut sehr nahekommen. Entsprechend dem großen Stromaanteil sind die Gehalte der extracellulär vorkommenden Metabolite Lactat, Pyruvat und Glucose höher als die der intracellulären Substanzen. Letztere dürften wohl vor allem auch dem Epithel zuzuordnen sein. Der Lactatgehalt der normalen Hornhaut (Tabelle 1) stimmt mit den Angaben von MORLEY und TOTH überein. Er ist etwa genau so hoch wie im Kammerwasser (REDDY, REIM).

Die Gehalte der normalen Hornhaut an α -GP, DAP, Malat, G-6-P und FDP sind relativ niedrig. Eindeutige Veränderungen dieser Metabolite konnten, wahrscheinlich aus methodischen Gründen während der Lagerung der isolierten Hornhaut nicht beobachtet werden. Die L/P- und GP/DAP-Quotienten der Hornhaut haben dieselbe Größenordnung wie im Skelettmuskel (HOHOKST).

In der Literatur sind vor allem für die Adenosinphosphate Vergleichswerte zu finden (vgl. Tab. 1). Es handelt sich hierbei allerdings um Untersuchungen der Rinder- und Schweinehornhaut. Nach eigenen stichprobenartigen Analysen der Rinderhornhaut scheint es, daß die Unterschiede der Tierarten in dieser Hinsicht nicht sehr groß sind. Die ATP-Werte von HERRMANN und LICHMANN, SÖLLNER und SULMANN liegen um 25 - 60 % tiefer als die in dieser Arbeit gefundenen Werte. Die Summe der Adenosinphosphate beträgt bei diesen Autoren nur 40 - 60 % unserer Werte. Der ATP/ADP-Quotient erreicht nach den Ergebnissen von SÖLLNER nur 30 % bzw. 45 % der von uns ermittelten Relationen.

Das Verhältnis von ATP/ADP gibt nach BÜCHER und KLINGENBERG einen wichtigen Aufschluß über den Zustand des Energiestoffwechsels. HÖRST und Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Höhe des ATP/ADP-Quotienten in der Leber von der Art der Präparation abhängt und durch verschiedene Alterationen des Gewebes herabgesetzt wird. Auch REIM konnte in der Tränendrüse eine Abnahme des ATP/ADP-Quotienten bei Schädigung des Gewebes durch Ischämie feststellen. Unter diesem Aspekt scheint die Annahme erlaubt, daß die Unterschiede der ATP/ADP-Quotienten in der Hornhaut zwischen den Angaben der Literatur und dieser Arbeit im wesentlichen auf methodische Maßnahmen zurückzuführen sind.

Auffallend war das Verhalten der Adenosinphosphate der isolierten Hornhaut bei Lagerung in Luft. Die Abbildungen 2 und 4 zeigen, daß die Klarheit der Hornhaut vom Gehalt an Adenosinphosphaten, besonders aber vom ATP/ADP-Quotienten abhängt. Wenn der ATP/ADP-Quotient abzusinken beginnt, sind mit bloßem Auge an der Hornhaut noch keine Veränderungen zu erkennen. Erst bei einem ATP/ADP-Verhältnis von 2.5 sieht man eine zarte Trübung der Hornhaut. Bei einer deutlich sichtbaren Trübung der Hornhaut ist bereits der ganze Energiestoffwechsel der Hornhaut zusammengebrochen. Alle gemessenen Substratgehalte sind zu diesem Zeitpunkt beträchtlich vermindert, der ATP/ADP-Quotient liegt unter 1.0 .

SÖLLNER und HOCKWIN fanden in der getrübbten isolierten Hornhaut einen kleineren ATP/ADP-Quotienten als in der frischen Cornea. Sie kamen zu dem Schluß, daß mit dem Zusammenbruch des Energiestoffwechsels die Hornhaut trübe wird. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Vermutung bestätigt werden. Wir fanden allerdings ein wesentlich größeres Gefälle des ATP/ADP-Quotienten mit der Eintrübung der Hornhaut. Außerdem konnte durch die Analyse in verschiedenen Stadien der Lagerung und der Trübung die enge Beziehung zwischen dem Abfall des ATP/ADP-Quotienten und dem Anstieg der Trübungskurve dargestellt werden.

Eine solche Beziehung zwischen Funktion und Energiestatus wurde auch für isolierte Blutzellen, Erythrocyten und Thrombocyten gefunden (LÖHR, WALLER, GROSS, GRIGNANI). HÖRST, REIM und BARTELS machten auf dieses Verhältnis im arbeitenden Skelettmuskel aufmerksam. Wie aus den Abbildungen 3 und 4 ersichtlich, verschwindet alle Glucose aus der Hornhaut in sehr kurzer Zeit. Es erhebt sich die Frage, welche Energiequelle der Stoffwechsel der isolierten Hornhaut verwendet. Nach überschlagsmäßiger Schätzung wird das im Hornhautepithel reichlich vorhandene Glycogen (HERRMANN, HICKMANN, KAMAI, REIM) in 5 bis 10 Stunden verbraucht. Nach dieser Zeit muß der Stoffwechsel des Hornhautgewebes aus einer anderen Energiequelle gespeist werden.

Der kontinuierliche Abfall von Lactat und Pyruvat bei Lagerung in Gegenwart von Luftsauerstoff läßt vermuten, daß aus dem großen Lactatvorrat über das Gleichgewicht Lactat/Pyruvat weiterhin genügend Brennstoff für den oxydativen Stoffwechsel geliefert wird. Ob die Oxydationen nur über den Citronensäurecyclus ablaufen, oder auf dem von KUROSHITA für die Linse postulierten Weg über die Oxydation von TFM durch Pyruvat kann aus den vorliegenden Befunden nicht entnommen werden.

Ein ATP/ADP-Quotient, der wie in der klaren Hornhaut größer als 3,2 ist, wurde bisher nur in atmenden Geweben gefunden, deren oxydativer Stoffwechsel nicht gestört war. Glycolysierende Gewebe haben ATP/ADP-Quotienten von 1.0 bis 2.0. In ihnen wird Lactat angehäuft. Die Tatsachen, daß in unserer isolierten und in Luft aufbewahrten Hornhaut hohe ATP/ADP-Quotienten, relativ niedrige und konstante L/I-Quotienten vorliegen, und Lactat nicht angehäuft wird, sondern im Gegenteil verbraucht wird, sprechen dafür, daß in der unter diesen Bedingungen isolierten Hornhaut der oxydative Stoffwechsel intakt und für die Klarheit verantwortlich ist. Der oxydative Stoffwechsel hat sicher für die Hornhaut eine besondere Bedeutung.

In unseren Versuchen tritt die Trübung der isolierten Hornhaut bereits nach 70 - 80 Stunden ein. SÖLLNER konnte erst nach 120 Stunden und mehr eine Trübung der Hornhaut beobachten. Die Lagerungsbedingungen von SÖLLNER unterscheiden sich von unseren nur durch die Temperatur, SÖLLNER lagerte die Hornhaut bei $+4^{\circ}\text{C}$, während unsere Hornhaut bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ}\text{C}$) aufbewahrt wurde. Nach der RGT-Regel ist es verständlich, daß bei höherer Temperatur alle Stoffwechselvorgänge, die mit der Trübung der Hornhaut enden, schneller ablaufen.

In SÖLLNERS und in der vorliegenden Arbeit zeigen die Trübungskurven zu Beginn einen Abfall, d.h. die Hornhäute wurden zuerst klarer. Es wäre möglich, daß diese Erscheinungen auf die Rückbildung eines Epithelödems oder eine Entquellung der Hornhaut zurückgeführt werden können. Untersuchungen wurden über diese Frage nicht angestellt.

Die Behauptung, die wir für die Beziehung der Adenosinphosphate zur Trübung der isolierten Hornhaut in Luft aufstellten, gilt auch für die Versuche, die wir mit der Hornhaut in CO_2 -Atmosphäre machten. Die Abbildungen 5 bis 7 zeigen, daß auch hier die Trübung der Hornhaut mit dem Abfall der energiereichen Phosphate eng gekoppelt ist. Sehr deutlich wird dieser Zusammenhang an dem Verhalten des sehr empfindlichen ATP/ADP-Quotienten, der schon in den ersten 3 Stunden auf 2,2 absinkt. Nach O_2 -Entzug spielen sich die entscheidenden Vorgänge im Energiestoffwechsel in den ersten beiden Stunden ab. Das hohe Energiepotential mit einem ATP/ADP-Quotienten von 4,8 wird bei O_2 -Mangel sehr schnell abgebaut. Mit seinem raschen Absinken tritt die frühzeitige Trübung der Hornhaut ein. Die enge Beziehung zwischen dem Abfall des ATP/ADP-Quotienten und dem Anstieg der Trübungskurve wurde mit diesen Versuchen erneut belegt. SÖLLNER hat gezeigt, daß in vivo das Hornhautepithel trübe wird, wenn durch Ausschluß des Luftsauerstoffes die oxydative Atmung des Epithels verhindert wird. Unsere Versuche zeigen ganz ähnliche Ergebnisse.

Durch die CO_2 -Atmosphäre wird der Luftsauerstoff entzogen und der Stoffwechsel der isolierten Hornhaut von der Oxydation auf die Glycolyse umgestellt. Es kommt (Abb.6) zu einem beschleunigten Abbau des Pyruvats. Bereits in der ersten Stunde sinkt der Pyruvatgehalt auf ein Drittel seines Normalwertes ab. Das Lactat steigt in den ersten 5 Stunden beständig an, die Glucose fällt in derselben Zeit bis auf den Nullwert ab. Dieses Verhalten von Lactat und Glucose läßt auf eine Umwandlung der Glucose in Lactat schließen. Nach überschlagsmäßiger Berechnung wird ein Molekül Glucose in zwei Moleküle Lactat umgewandelt, wie die Werte aus Abb.6 und Tabelle 4 (methodischer Anhang) zeigen. Wie in der isolierten Hornhaut vorhandene Glucose scheint dem Hornhautgewebe eine zeitlang, in unseren Versuchen etwa 5 Stunden, als Energiequelle zu dienen. Nach der Verarmung des Gewebes an Glucose verarbeitet der Stoffwechsel andere Metabolite und gewinnt aus ihnen die erforderliche Energie. Als Brennstoffreserve für den Gewebsstoffwechsel nach Verbrauch der Glucose kommt wiederum in erster Linie das Glycogen in Frage, das nach KALAI und REIL in Epithel der Hornhaut in hoher Konzentration vorhanden ist.

Das Ansteigen des Lactatgehaltes ist als sicheres Zeichen dafür zu werten, daß der Stoffwechsel der Hornhaut jetzt anaerob arbeitet. Die Glycolyse verläuft immer langsamer, je mehr Lactat im Gewebe angehäuft ist. Nach etwa 10 Stunden stellt sich in unseren Versuchen ein Gleichgewicht ein, das in dem Verhalten der ATP/ADP-Quotienten und L/P-Quotienten, unseren Kriterien für Veränderungen im Metabolitstatus, zum Ausdruck kommt. Beide Quotienten zeigen bei weiterer Versuchsdauer nur noch geringfügige Veränderungen.

Bereits 5 Stunden nach Versuchsbeginn erreicht der ATP/ADP-Quotient seinen kritischen Wert, der etwa bei 2.0 liegen dürfte. Ähnlich wie bei der in Luft gelagerten,

isolierten Hornhaut ist auch hier der Energiestoffwechsel soweit eingeschränkt, daß die Hornhaut trübe wird. Die enge Beziehung zwischen ATP/ADP-Quotienten und Hornhauttrübung ist nicht zu verkennen. Der schnelle Zusammenbruch des Energiestoffwechsels der Hornhaut, der bei Sauerstoffentzug eintritt, spricht dafür, daß der oxydative Stoffwechsel für die Klarheit der Hornhaut von ausschlaggebender Bedeutung ist. Abbildung 4 zeigt, daß diese wichtigen Stoffwechselreaktionen bei Aufbewahrung der isolierten Hornhaut in Luft erst nach 60 bis 70 Stunden beeinträchtigt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt bleiben die ATP/ADP- und L/P-Quotienten annähernd normal. Ein Vergleich dieses Befundes mit den Ergebnissen der CO₂-Versuchsreihe zeigt, daß diese Reaktionen bei O₂-Entzug schon in den ersten beiden Stunden, also bedeutend schneller eintreffen (Abb.7). Dieser Vergleich berechtigt zu der Folgerung, daß das Energiepotential des Stoffwechsels etwa zehnmal schneller verloren geht, wenn der Hornhaut der Sauerstoff entzogen wird. Die Trübung der Hornhaut läuft diesem Stoffwechselgeschehen parallel.

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß der Energiestoffwechsel der Hornhaut sehr eng mit ihrem Funktionszustand gekoppelt ist. Die Eintrübung der Hornhaut läuft mit einer Abnahme der energiereichen Phosphate ATP, ALP und AMI parallel. Der Abfall des ATP/ADP-Quotienten eines der deutlichsten Zeichen der Gewebsalteration zeigt eine sehr enge Beziehung zur Trübungskurve der Hornhaut. Die Verarmung des Hornhautgewebes an energieliefernden Substraten führt zum Versiegen der Energiequelle des Stoffwechsels und beschleunigt den Trübungsprozess der Hornhaut.

VI. Zusammenfassung:

Die Anwendung von enzymatisch-optischen Methoden machte es möglich, im Extrakt der Kaninchenhornhaut gleichzeitig mehrere Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels zu bestimmen.

1) Es wurden 11 Metabolite der normalen Kaninchenhornhaut untersucht. Schonende Behandlung des Gewebes und Fixierung des Gewebsstoffwechsels in flüssiger Luft führten zu Ergebnissen, die dem in vivo Gehalt sehr nahe kommen dürften. Die Metabolitgehalte der Hornhaut an Lactat, Pyruvat, α -Gp, DAP, Malat, G-6-P, FDP, Glucose, ATP, ADP, AMP sind in der Tabelle 1 und in Form eines Metabolitmusters in Abbildung 1 zusammengefaßt.

2) Die verschiedenen Stadien der Eintrübung wurden mit bloßem Auge und objektiv mit dem Photometer registriert. Die Beobachtung des zeitlichen Ablaufes der Hornhauttrübung erfolgte in CO_2 -Atmosphäre über 15 Stunden und in Luftumgebung 120 Stunden lang.

3) In Gegenwart von Luftsauerstoff nimmt der Glucosegehalt der isolierten Hornhaut in 30 Minuten bis zur Grenze der nachweisbarkeit ab. Bei Aufbewahrung der Hornhaut in CO_2 -Atmosphäre ist die Glucose erst nach 5 Stunden aus dem Gewebe verschwunden.

4) Der Lactat- und Pyruvatgehalt der Hornhaut fällt in der Luftumgebung kontinuierlich ab, nach 90 Stunden sind sie nicht mehr nachweisbar. Der L/P-Quotient bleibt über 50 Stunden konstant, um erst nach dieser Zeit abzusinken. Nach Verdrängung der Luft durch CO_2 fällt das Pyruvat sehr stark ab, das Lactat nimmt dagegen zu. Der L/P-Quotient steigt gleich bei Versuchsbeginn sehr steil an.

5) Die energiereichen Phosphatverbindungen ATP, ADP und AMP werden in beiden Versuchsreihen geringer. Bei Anwesenheit von Sauerstoff fallen sie langsamer ab als unter anaeroben Bedingungen.

6) Die ATP/ADP-Quotienten verhalten sich in beiden Versuchen gleich. In der Luftumgebung fallen sie nach 50 - 60 Stunden steil ab, nach Entzug des Sauerstoffs schon nach zwei Stunden.

7) Zwischen der Lintrübung der Hornhaut und den Veränderungen der Metabolite des Energiestoffwechsels bestehen sehr enge Beziehungen. Mit der Zunahme der Trübung nimmt der Gehalt an allen Metaboliten ab. In der CO_2 -Atmosphäre nimmt der Lactatgehalt auf Grund der einsetzenden Glycolyse zu und der L/P-Quotient steigt an.

M E T H O D I S C H E R A N H A N G

Hornhaut Nr.	L	P	L/P	α -GP	DAP	G/D	Malat	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	Σ AP
1	9750	334	29	65	-	-	48	-	-	3770	201	49,5	4.0	336	587
2	9670	318	30	58	-	-	42	46	10.0	3060	410	85	4.8	205	700
3	7500	224	34	107	-	-	59	20	9.7	2860	438	80	5.5	235	753
4	14100	397	36	80	-	-	95	38	11.0	3800	583	114	5.1	592	1289
5	8200	397	21	58	-	-	68	57,8	5.3	4470	515	94	5.5	262	871
6	5980	222	27	50	-	-	61	-	-	4660	430	99	4.4	358	887
7	7400	223	33	80	-	-	65	-	16.0	3400	525	162	3.2	468	115
8	7050	240	29	40	9	4.1	-	31	9.5	2660	335	67	5.0	171	573
9	8200	279	30	-	-	-	50	-	7.4	3740	426	77	5.5	301	804
10	7250	313	23	72	-	-	70	-	16.5	4500	359	73.5	4.9	225	658
11	9050	338	29	46	30	1.5	60	-	15.0	4800	503	93.5	5.4	327	924
12	5650	203	28	42	21	2.0	46	18	8.8	3070	378	68.5	5.5	280	727
13	5270	168	31	-	-	-	-	-	6.0	-	368	92	4.0	-	-
14	7850	284	28	88	-	-	58	-	5.5	-	381	99	3.9	415	895
15	8200	236	35	57	7	8.3	-	-	9.2	-	450	92	4.9	283	825
16	-	-	-	-	10	-	-	31	5.5	-	387	77	5.0	296	748

Tabelle 2

Einzelwerte der Metabolitgehalte der normalen Hornhaut

Angabe der Werte in mMol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Stunden	L	P	L/P	α -GP	DAP	Malat	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP
8	9650	279	35	36	-	72	19	11	-	418	71	5.9	260
16	5350	132	40	-	-	87	11	4	-	344	67	5.1	229
24	5070	136	37	-	-	-	-	7	-	305	56	5.4	224
32	5050	156	33	-	-	48	8	6	-	244	48	5.0	164
48	2210	45	48	-	-	-	-	-	-	178	39	4.7	120
54	1680	96	18	-	-	-	-	-	-	340	76	4.5	148
60	4100	138	29	-	-	-	-	-	-	205	70	3.0	190
65	2370	153	16	-	-	-	-	-	-	223	94	2.4	320
69	1270	38	33	-	-	-	-	-	-	100	57	1.7	200
75	1510	100	15	-	-	-	-	-	-	154	102	1.5	182
85	1740	113	15	-	-	-	-	-	-	14	69	0.2	48
92	610	31	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	148	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3

Metabolitgehalte der Hornhaut nach Lagerung in Luft

Angabe der Werte in nMol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Stunden	L	P	L/p α -GP	DAP	G/D	Malat	G-6-P	FDP	Glucose	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP
1/4	5900	100	59	-	-	-	31	-	1840	238	64	3.7	310
1/2	9250	100	92	25	-	-	13	11	1870	345	79	4.3	440
3/4	10200	102	100	97	-	70	31	-	2490	360	113	3.2	-
1	7100	59	120	9	-	-	25	-	1700	222	64	3.5	172
1 1/2	7750	60	129	9.5	-	-	19	-	1760	62.5	24.6	2.5	-
2	13900	104	134	-	-	-	-	-	2550	217	71	3.0	550
2 1/2	12400	89	140	11	-	-	60	10	2320	277	122	2.2	550
4	15100	82	157	19	-	35.5	49	7	830	243	110	2.2	117
4 1/2	8650	55	157	34	-	-	192	-	1540	212	96	2.2	413
5	12800	94	136	9	-	-	23	-	810	184	96	1.9	147
8	14900	93	160	-	-	-	60	-	690	193	84	2.3	372
9	12600	79	160	-	-	-	186	-	775	109	54	2.0	358
10	8950	55	162	66	-	27	52	5	25	103	34	2.7	233
11	10350	76	136	-	-	-	13	5	-	159	78	2.0	-
14	14200	95	150	-	-	-	19	30	28	175	74	2.3	330
17 1/2	12000	73	164	-	-	-	7	-	-	75	51	1.5	325
22	15400	81	185	-	-	-	-	-	11	44	35	1.2	-
25	13800	80	172	9	-	98	-	-	-	101	49	2.0	285

Tabelle 4

Metabolitgehalte der Hornhaut nach Lagerung in CO₂-Atmosphäre

Angabe der Werte in mMol/g Frischgewicht (10^{-9} Mol)

Verzeichnis der Abkürzungen:

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Ald	Aldolase
LTs	Brenztraubensäure
DPN ⁺	oxydiertes Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
FDP	Fructosediphosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GDH	Glycerin-1-phosphatdehydrogenase
GSH	Glutathion
α GP	= G-1-P = Glycerin-1-phosphat
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
HK	Hexokinase
LDH	Lactatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
MEK	Myokinase
CAA	Oxalacetat
PDP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PLI	Phosphophosphatisonomerase
TPN ⁺	oxydiertes Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	reduziertes Triphosphopyridinnucleotid
TRAP	Tridethanolaminpuffer
ZF	Zwischenferment

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Straub, daß ich an seiner Klinik arbeiten durfte.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. M. Reim verpflichtet. Neben dem klinischen und poliklinischen Dienst übernahm er es, mich in die Methodik der enzymatisch-optischen Analyse einzuführen. Er gab mir viele Anregungen zur Ausführung der Arbeit. Manche Stunde seiner Freizeit opferte er für die Laborarbeit. Für die Besprechung von den häufig auftretenden Fragen hatte er immer Zeit.

Der biochemisch-technischen Assistentin, Fräulein H. Siefert, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die technische Assistenz.

Die Operationsphotografien des methodischen Teils dieser Arbeit machte ich mit der
EDIXA-Spiegelreflex-Kleinbildkamera,
Schneider-Kreuznach Xenar 1:2.8/50 mm
Zwischenringe 1,2,3,4
Elektronenblitz
Filmmaterial: ADOX KB 17

An dieser Stelle möchte ich meinen verehrten akademischen Lehrern, den Herren Professoren und Dozenten danken:

Eberhard-Karls-Universität Tübingen:

BARBEY, BARTELS, BRECHT, FENEIS, GRELL, KRÜGER, MÖRICKE,
MÜLLER, NULTSCH, RÜDORFF, TONUTTI, WEITZEL

Universität Innsbruck:

GABEL, GÜNTHER, HALHUBER, HITTMAIR, HUBER, KONZETT, LANG,
LUTZ, TAPFER

Philipps-Universität Marburg:

BECKMANN, BERENDES, DITTRICH, DÖLLE, DU MESNIL DE ROCHEMONT,
EXNER, BRAUN-FALCO, GEDIK, HEUSER, HILDEBRANDT, HORNUNG, HAMM,
HARTMANN, JACOB, KOTTEYER, LANG, LINNEWEH, LÜBBERS, MANN,
MARTINI, MARX, NEUBAUER, GRÜTER, HESS, ROHEN, SCHMID, SCHMIDT,
SCHLEYER, SCHÖLMEIRICH, SCHWAIGER, SIEGERT, SIESS, STREICHER,
STENDER, STRAUB, RODENHÄUSER, WÜRTERLE

Lebenslauf

Am 6. August 1937 wurde ich als Sohn des Kriminaloberkommissars Paul Lichte und seiner Ehefrau Lilly Lichte, geborene Benekenstein in Emden/Ostfriesland geboren.

Ich besuchte vom Herbst 1944 bis zum vierten Schuljahr die Volksschule in Emden, danach das Gymnasium für Jungen in Emden. Im Februar 1959 bestand ich die Reifeprüfung.

Vom Sommersemester 1959 bis zum Wintersemester 1959/60 studierte ich an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen Jura. Das Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1960 in Tübingen, bestand nach zwei Semestern das Vorphysikum und nach drei weiteren Semestern das Physikum.

Im Wintersemester 1962/63 studierte ich an der Universität in Innsbruck/Österreich.

Die Philipps-Universität zu Marburg an der Lahn besuche ich seit dem Sommersemester 1963.

Während der Semesterferien habe ich im Städtischen Krankenhaus in Emden und am Amtssygehuset in Haderslev (Dänemark) famuliert.

Die Philipps-Universität zu Marburg an der Lahn besuchte ich vom Sommersemester 1963 bis zum Wintersemester 1965, in dem ich das medizinische Staatsexamen ablegte.

Literaturverzeichnis

- ANSETH, A. Experimental EYE Res. 1961
de BERARDINIS und de VINCENTIIS, M. Rass. Ital. Ottal.
29, 164, 1950
- BÜCHER, Th. und KLINGENBERG, M. Angew. Chemie 70, 17/18, 552, 1958
- BUSSE-GRAWITZ, P. A.v. Graefes Arch. f. Ophth. 141, 59, 1939
- CALMETTES, L. u. a. Arch. Ophth. Paris 16, 481-506
- DARDENNE, M. U. und SAYEGH, E. Ber. über d. 65. Zusammenkunft
d. dt. Ophth. Ges. Heidelberg 1963. I. F. Bergmann Verlag
München, S. 404 ff. 1964.
- DAVSON, H. Biochem. J. 59, 24, 1954
- DELBRÜCK, A. Klin. Wschr. 41, 10. Heft, 488, 1963
- FILATOW, W. P. Z. Augenheilkunde 65, 147, 1928
Z. Augenheilkunde 69, 279, 1929
- HARRIS, I. E. Amer. J. Ophth. 44, 262, 1957
- HERRMANN, H. und HICKMANN, F. Bull. Johns Hopkins Hosp.
82, 225; 82, 182; 82, 260, 1948
- HERRMANN, H. und LEBEAU, M. J. of Cell Bio. 13, 465, 1962
- HERRMANN, H. und MOSES, S. G. und FRIEDENWALD, J. S.
Arch. Ophth. Chicago 28, 652, 1942
- HOHORST, H. J. Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte
in der quergestreiften Muskulatur der Ratte.
Habil.-Schrift. Marburg 1961.
- HOHORST, H. J. Diplomarbeit, naturwiss. Fakultät, Marburg 1957
- HOHORST, H. J. KREUTZ, F. H. BÜCHER, Th. Biochem. Z. 332, 118, 1959
- HOHORST, H. J. REIM, M. BARTELS, H. Biochem. Biophys. Res. Comm.
7, 142, 1962
- KAMAI, T. Acta Soc Ophth. Japan. 63, 934, 1959
- KINOSHITA, J. H. und MEROLA, L. O. Exp. Eye Res. 1, 53, 1961
- KINOSHITA, J. H. und MASURAT, T. Americ. J. Ophth. 48. July Pt II. 47
- KRAUSE, A. C. Biochemistry of the Eye. Baltimore,
John Hopkins Press 1934
- KRAUSE, A. C. und STACK, A. M. Arch. Ophthalm. Chicago, 22, 66, 1939
- LANGHAM, M. E. J. Physiol. 117, 461, 1952; 126, 396, 1954.
- LANGHAM, M. E. und TAYLOR, S. Brit. J. Ophth. 40, 321, 1956
- LANGHAM, M. E. Corneal metabolism and its influence on corneal
hydration in the excised eye and in the living animal.
In "The Transparency of the Cornea" W. S. Duke Elder
and E. S. Perkins eds. Blackwell, Oxford, 1960.

- LÖHR, G.W., WALLER, H.D., KARGES, D., SCHLEGEL, B. und MÜLLER, A.
Klin. Wschr. 1008, 1958
- LÖHR, G.W., WALLER, H.D. und GROSS, R. Dt. med. Wschr.
86, 897, 1961; 86, 946, 1951.
- MORLEY, N.H., TOTH, A. Canad. J. Biochem. 39, 477, 1961.
- MORNER, C.T. Zeitschr. f. Physiol. Chemie 18, 213, 1894.
- PAU, H. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 154, 579, 1954.
- PUPENKO, B. Augenkl. med. Odessa 1936, 77.
- RAUEN, H.M. Biochemisches Taschenbuch, 3. Aufl. 1964
Springer Verlag.
- REDDY, D.V.N. und KINSEY, V.E. A.M.A. Arch. Ophth.
63, 715, 1961.
- REIM, M. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. 167, 549, 1964.
- REIM, M. unveröffentlicht
- REIM, M. SCHMIDT, F. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. im Druck.
- REIM, M. SCHRAMM, H.P. A.v. Graefes Archiv f. Ophth. im Druck.
- REISINGER, H. Bayr. Ann. f. Abh., Erfindung und Beobachtung
a.d. Geb. Chir. Augenheilk. u. Geburtsh. 1. H. 1, 207, 1824.
- de ROETH, A. Archiv Ophth. N.Y. 45, 139, 1951; 44, 666, 1950.
- SCHAEFFER, A.J., MURRAY, J.D. Arch. Ophth. Chicago. 44, 833, 1950.
- SIMONELLI, M. Boll. d'Ocul. 20, 163, 1941.
- SMELSER, G.K. In "The Transparency of the Cornea"
W.S. Duke Elder and E.S. Perkins, eds. Blackwell
Oxford, 1961.
- SÖLLNER, F. A.v. Graefes Arch. f. Ophth. 165, 600, 1963; 167, 150, 1964.
- SÖLLNER, F. und HOCKWIN, O. A.v. Graefes Arch. 167, 467, 1964.
- SÜLLMANN, H. Handbuch der Physiol. Chemie, Band II, 2a, S. 864.
- WALLER, H.D., LÖHR, G.W., GRIGNANI, F. und GROSS, R.
Über den Energiestoffwechsel normaler menschlicher
Thrombocyten. Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica.
3, 520, 1959.
- WEEKERS, R. Recherches expérimentales et clinique concernant
la pathogénie des cataractes 1941, Thèse d'Agrégation
Univ. Liège.
- WOODIN, A.M. Biochem. J. 51, 319, 1952.



